

**Vergleichende Untersuchungen zur
Struktur, Funktion und Regulation der fünf c-di-
GMP-spezifischen CSS-Domänen-
Phosphodiesterasen in *Escherichia coli***

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor Rerum Naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin von

MSc. Martin Lorkowski

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Regine Hengge
2. Prof. Dr. Marc Erhardt
3. Prof. Dr. Kürşad Turgay

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2020

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen November 2013 und September 2018 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regine Hengge an der Humboldt-Universität zu Berlin.

PUBLIKATION

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Publikation enthalten:

Herbst, S., **Lorkowski, M.**, Sarenko, O., Nguyen, T. K. L., Jaenicke, T., & Hengge, R. (2018). Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di-GMP phosphodiesterase. EMBO J, 37(8).

DANKSAGUNGEN

Ein großer Dank gilt vor allem Prof. Dr. Regine Hengge für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe an diesem spannenden und komplexen Thema zu arbeiten. Durch viele motivierende Gespräche und Diskussionen hat Prof. Dr. Hengge maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Zusätzlich gebührt mein Dank den weiteren Gutachtern sowie Kommissionsmitgliedern, die viel Zeit in die Bewertung dieser Arbeit investiert haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an die gesamte AG Hengge. Seit meinem Beginn bis heute sind zahlreiche Mitglieder der Arbeitsgruppe gegangen und neu hinzugekommen. Doch es herrschte immer eine sehr angenehme und freundschaftliche Atmosphäre, mit viel Spaß an der wissenschaftlichen Arbeit. Vielen Dank für die schöne Zeit.

Ein großes Dankeschön geht natürlich an Susanne Herbst mit der ich mich durch die thematische Nähe unserer Projekte immer austauschen und dadurch wertvolle Anregungen gewinnen konnte. Ich bedanke mich auch bei Alexandra Possling, Diego Serra, Sandra Lindenberg, Giesela Becker, Anja Richter, Vanessa Pfiffer und Kim Nguyen, die in allen Belangen immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein großes Dankeschön geht auch an die AG Eitinger und AG Tschowri, nicht nur für die wissenschaftliche Unterstützung, sondern auch für die zahlreichen Grillabende in geselliger Runde.

Abschließend geht ein besonderer Dank an meine Familie für die tatkräftige Unterstützung und Anteilnahme. Besonders nennen möchte ich hier meine Frau Isabel und meine Kinder Hannah und Marie, die mich immer motiviert und durch alle Höhen und Tiefen begleitet haben. Ohne sie wäre Vieles nicht möglich gewesen. Vielen Dank euch für die großartige Unterstützung und das Durchhaltvermögen!

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	INHALTSVERZEICHNIS.....	I
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
III.	TABELLENVERZEICHNIS.....	V
IV.	ABKÜRZUNGEN	VI
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	IX
VI.	SUMMARY.....	X
1	EINLEITUNG	1
1.1	Von der Flüssigkultur zum Biofilm	1
1.2	Regulationsmechanismen in <i>Escherichia coli</i>	2
1.2.1	Sigmafaktoren.....	2
1.2.2	Transkriptionsfaktoren.....	3
1.2.3	Bis-(3',5')-zyklisches di-Guanosin-Monophosphat - c-di-GMP	4
1.3	Säureresistenz in <i>Escherichia coli</i>	5
1.3.1	Auswirkungen von niedrigen pH-Werten auf die Bakterienzelle.....	6
1.3.2	Säureresistenzmechanismen in <i>Escherichia coli</i>	7
1.4	Das Disulfidbrücken-generierende System in <i>Escherichia coli</i>	10
1.5	Die Familie der <i>High Temperature Requirement A</i> Proteasen.....	11
1.6	Physiologie der Biofilmbildung in <i>Escherichia coli</i> K12	13
1.6.1	Das Konzept der Biofilmarchitektur	13
1.6.2	Prinzipien der c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion	15
1.7	CSS-Phosphodiesterasen.....	19
1.7.1	PdeC als Model für die transmembrane Redox-Kontrolle	19
2	ZIELSETZUNG.....	22
3	MATERIAL & METHODEN	23
3.1	Chemikalien und Materialien	23
3.2	Puffer	25
3.2.1	Allgemeine Puffer und Färbelösungen	25
3.2.2	Puffer zur Reinigung von löslichen Proteinen	27
3.2.3	Puffer zur Reinigung von Membranproteinen.....	28
3.3	Rezepte für Flüssigmedien und Agarplatten	29
3.3.1	Flüssigmedien	29
3.3.2	Festmedien	31
3.4	Verwendete Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	31
3.5	Mikrobiologische Arbeitsmethoden	38
3.5.1	Sterilisation	38
3.5.2	Wachstumsbedingungen.....	38
3.5.3	Aufbewahrung von Bakterienstämmen	38
3.5.4	Antibiotika	38
3.5.5	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen.....	38

3.5.6	Herstellung eines P1-Lysates	39
3.5.7	P1-Transduktion.....	39
3.5.8	Untersuchungen zur Biofilmbildung auf Festmedien	39
3.5.9	Entnahme von Proben aus Bakterienkulturen.....	39
3.6	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	40
3.6.1	Verwendete Kits.....	40
3.6.2	Verwendete Oligonukleotide	41
3.6.3	Polymerasekettenreaktion.....	45
3.6.4	Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt-PCR und Konstruktion von Niedrig-Kopienzahlvektoren.....	45
3.6.5	Agarose-Gelelektrophorese	46
3.6.6	Restriktionsverdau & Vektordephosphorylierung	46
3.6.7	Ligation von Insert und Vektor	46
3.6.8	Elektrokompetente Zellen	47
3.6.9	Elektrotransformation	47
3.6.10	TSS-Transformation.....	48
3.7	Biochemische Arbeitsmethoden	48
3.7.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli.....	48
3.7.2	Sensitive Coomassiefärbung von SDS-Gelen.....	49
3.7.3	Immunoblot-Analyse (Western-Blot)	49
3.7.4	Bestimmung der Genexpression mittels β -Galaktosidase-Assay nach Miller.....	49
3.8	ProteinProtein-basierte Methoden.....	50
3.8.1	Überexpression und Reinigung von löslichen Proteinen	50
3.8.2	Überexpression und Reinigung von Membran-Proteinen.....	51
3.8.3	Inkorporation von Membran-Proteinen in 'Nanodiscs'	51
3.8.4	Nachweise enzymatischer Aktivität von PDEs	52
3.9	Datenbanken	52
4	ERGEBNISSE.....	53
4.1	Charakterisierung der CSS-Domäne von PdeC als DSB/Thiol-Schalter.....	53
4.1.1	PdeC ^{EALAC} und PdeC/N sind aktive Phosphodiesterase	53
4.1.2	Gereinigtes PdeC zeigt eine Redox-abhängige Phosphodiesterase-Aktivität in Nano-Discs.....	54
4.2	Vergleichende Analyse der CSS-Phosphodiesterasen aus <i>Escherichia coli</i> K12.....	56
4.2.1	Die CSS-Phosphodiesterasen zeigen eine hohe Varianz in der Aminosäureabfolge der CSS-Domäne 56	
4.2.2	Chromosomale Expression der CSS-Phosphodiesterasen in <i>Escherichia coli</i> K12.....	59
4.2.3	Aktivitätsmuster der fünf CSS-Phosphodiesterasen	60
4.2.4	Redox-induzierte proteolytische Prozessierung	63
4.2.5	Proteolyse als Antwort der auf einen veränderten Redox-Status der konservierten Cysteine	67
4.2.6	Induktion der CSS-Domänen-PDEs und die Beteiligung von DsbA und den Protease DegP und DegQ 68	
4.3	pH-abhängige Stabilisierung der CSS-Domänen-Phosphodiesterase PdeN	73
4.3.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Makrokolonieentwicklung und das Wachstum in Flüssigkulturen des Stammes <i>Escherichia coli</i> K12 AR3110.....	73
4.3.2	Beteiligung der CSS-Phosphodiesterasen an der pH-abhängigen Veränderung der Matrixproduktion in <i>Escherichia coli</i> K12	75
4.3.3	Expression von <i>pdeN</i> bei Wachstum auf saurem Medium.....	79
4.3.4	PdeN-Aktivität zeigt sich bei Wachstum bei pH 5,5	81
4.3.5	Die pH-abhängige Aktivierung von PdeN erfolgt auch bei einer Reduktion der konservierten Cysteine der CSS-Domäne.....	82
4.3.6	PdeN wird in Abhängigkeit des pH-Wertes induziert.....	85
4.3.7	Wachstum bei pH 5.5 induziert alle PdeN-Varianten	85
4.3.8	Die pH-abhängige Induktion von PdeN ist spezifisch für das Wachstum bei einem sauren pH	87

4.3.9	Die Proteasen DegP und DegQ sind nicht essentiell für die pH-abhängige Induktion von PdeN.....	87
4.3.10	Der N-Terminus von PdeN ist essentiell für die zelluläre Konzentration des Gesamtproteins	89
4.3.11	Die pH-abhängige Induktion von PdeN wird über den N-Terminus erreicht.....	90
4.3.12	PdeD zeigt eine pH-abhängige Induktion.....	92
4.3.13	PdeN ist an der Säurestressadaption von <i>E. coli</i> K12 in der stationären Phase beteiligt.....	94
5	DISKUSSION.....	97
5.1	Charakterisierung der CSS-Domäne von PdeC als DSB/Thiol-Schalter.....	97
5.2	CSS-Phosphodiesterasen.....	98
5.2.1	Struktureller Vergleich der fünf CSS-Phosphodiesterasen.....	98
5.2.2	Funktionaler Vergleich der fünf CSS-Phosphodiesterasen	101
5.2.3	Physiologische Funktion der CSS-PDEs.....	106
5.3	pH-abhängige Induktion der CSS-Domänen-Phosphodiesterase PdeN.....	107
5.3.1	Regulation und Funktionsweise von PdeN unter sauren Wachstumsbedingungen	107
5.3.2	N-terminale Regulation von PdeN.....	109
5.3.3	Physiologische Funktion von PdeN.....	112
6	LITERATUR	115
7	ACKNOWLEDGEMENT TO THE SOURCES OF FIGURES	128
8	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	129

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Säureresistenzmechanismen in <i>E. coli</i>	8
Abb. 2: Das DSB-System in <i>E. coli</i>	11
Abb. 3: Biofilmmatrixarchitektur in <i>E. coli</i>	13
Abb. 4: Kontrolle der physiologischen Differenzierung der Makrokolonie-Biofilmbildung in <i>E. coli</i>	18
Abb. 5: Modell der Funktionsweise von PdeC aus <i>Escherichia coli</i> steuert.....	20
Abb. 6: PdeC ^{EALAC} und PdeC/N sind aktive Phosphodiesterasen.....	54
Abb. 7: Gereinigtes PdeC zeigt eine Redox-abhängige PDE-Aktivität in Nano-Discs	55
Abb. 8: Abgleich der Aminosäuresequenzen der fünf CSS-Domänen-PDEs in <i>E. coli</i> K12	58
Abb. 9: Chromosomale Expression der CSS-Domänen-PDEs in Flüssigkulturen	59
Abb. 10: Auswirkungen der CSS-Domänen-PDEs und deren Varianten auf die Makrokoloniemorphologie	61
Abb. 11: Vergleich der Proteolysemuster der verschiedenen CSS-Domänen-PDE Varianten in Flüssigkultur	64
Abb. 12: Probenmengen der CSS-Domänen-PDEs zur Western Blot Analyse	66
Abb. 13: Prozessierung der CSS-Domänen-PDEs als Antwort auf den veränderten Redox-Status der konservierten Cysteine	67
Abb. 14: Stabilisierung der CSS-Domänen-PDEs über DsbA und DegP/Q-abhängige Proteolyse	69
Abb. 15: Auswirkung der proteolytischen Prozessierung der CSS-Domänen-PDEs auf die Matrixproduktion	71
Abb. 16: Einfluss des pH-Wertes auf die Makrokolonieentwicklung des Stammes <i>E. coli</i> K12 AR3110	74
Abb. 17: Einfluss der Pufferstärke auf das Wachstum in Flüssigkulturen.....	75
Abb. 18: Makrokolonien des Stammes AR3110 mit den entsprechenden Mutationen der Proteine mit GGDEF/EAL-Domäne bei pH 8	76
Abb. 19: Makrokolonien des Stammes AR3110 mit den entsprechenden Mutationen der Proteine mit GGDEF/EAL-Domäne bei pH 5,5	78
Abb. 20: Der pH-Effekt von PdeN wird nicht über die Transkription reguliert	80
Abb. 21: PdeN wird durch das Wachstum bei pH 5,5 induziert	81
Abb. 22: Die pH-abhängige Aktivierung von PdeN erfolgt auch bei einer Reduktion der konservierten Cysteine der CSS-Domäne.....	83
Abb. 23: Die pH-abhängige Aktivierung von PdeN senkt die Expression von <i>csgB</i> drastisch ab	84
Abb. 24: PdeN ^{WT} wird pH-abhängig induziert	85
Abb. 25: Wachstum bei pH 5.5 stabilisiert die PdeN ^{WT} Version.....	86
Abb. 26: Die pH-abhängige Induktion von PdeN ist spezifisch für das Wachstum bei einem sauren pH	87
Abb. 27: DegP und DegQ sind nicht allein für die pH-abhängige Induktion von PdeN verantwortlich	88
Abb. 28: Der N-Terminus ist essentiell für die Stabilität von PdeN	89
Abb. 29: Der N-Terminus ist für die pH-abhängige Induktion von PdeN verantwortlich.....	90
Abb. 30: Der N-Terminus ist für die pH-abhängige Induktion von PdeN verantwortlich.....	91
Abb. 31: PdeD zeigt eine pH-abhängige Induktion	92
Abb. 32: Auswirkungen der CSS-Domänen-PDEs auf die Makrokoloniemorphologie bei einem Wachstum auf LBnoS pH 5,5.....	93
Abb. 33: Säureüberlebensversuchs mit Adaptionphase nach Castanie-Cornet et al. 1999.....	95
Abb. 34: Modell zur Kontrolle der PDE-Aktivität der CSS-Domänen-PDEs in <i>E. coli</i> über den Redox-Status der periplasmatischen CSS-Domäne	103
Abb. 35: Theoretischer Verlauf der Proteinmengen der CSS-Domänen-PDEs in Flüssigkultur (LB-Medium).....	106
Abb. 36: Modell zur pH-abhängigen Induktion von PdeN	112

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Bezugsquellen der Chemikalien und Materialien.....	23
Tab. 2: Bezugsquellen der Geräte.....	25
Tab. 3: Zentrifugen	25
Tab. 4: Neue Bezeichnungen der Gene, die für GGDEF/EAL codieren nach Hengge et al. 2015	32
Tab. 5: Verwendete Bakterienstämme	32
Tab. 6: Verwendete Bakteriophagen-Lysate	36
Tab. 7: Verwendete Plasmide.....	36
Tab. 8: Liste der verwendeten Antibiotika.....	38
Tab. 9: Verwendete Kits	41
Tab. 10: Primer zur Herstellung chromosomaler Knockout-Mutanten	41
Tab. 11: Primer zur Klonierung von Überexpressionsplasmiden.....	41
Tab. 12: Sonstige Primer	43
Tab. 13: Synthetisch hergestellte Fragmente der Firma Integrated DNA Technologies	44
Tab. 14: Zusammensetzung der Polyacrylamidlösungen zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen	48
Tab. 15: Verwendete Proteinmarker	48
Tab. 16: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper	49
Tab. 17: Ansätze zur Rekonstitution von PdeC ^{WT} , PdeC ^{EALΔC} und PdeC/N in Nanodiscs	52
Tab. 18: Proteingrößen der verwendeten CSS-Domänen-PDE Konstrukte inklusive 6-His Tag	63

IV. ABKÜRZUNGEN

(p)ppGpp	Guanosin (penta)-tetraphosphat
ADAR	Arginin-abhängige Säure-Resistenz-System
AdiA	Arginin-Decarboxylase
AdiC	Arginin / Agmatin-Antiporter
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicilin
Amp ^R	Ampicilinresistent
APS	Ammonium Persulfate
ATP	Adenosintriphosphat
bspw.	Beispielsweise
Bzw.	Beziehungsweise
cdi-GMP	Bis-(3',5')-zyklisches di-Guanosin-Monophosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
CadB	Lysin / Cadaverin-Antiporter
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CFU	Kolonie-bildende Einheit 'Colony forming units'
CIP	Alkaline Phosphatase, <i>Calf Intestinal</i> (CIP)
CpxP	<i>Acylated precursor of colicin A lysis protein</i>
CR	Kongorotlösung
CRP	cAMP Rezeptor-Protein
Csg	<i>Cell surface glycoprotein</i>
CSS-Domänen-PDE	Cys-Ser-Ser-Domänen-Phosphodiesterase
Cyo	Cytochrom-b ₀ -Oxidase
DDM	n-Dodecyl β-D-maltoside
Deg	<i>Degradation enzyme regulation protein</i>
DGC	Diguanylatcyclase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPS	<i>DNA-binding protein from starved cells</i>
DSB	Disulfidbrücke
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Extracelluläre polymere Substanzen
EtOH	Ethanol
FHL	Formiat-Wasserstoff-Lyase-Komplexe
Fis	<i>Factor for inversion stimulation;</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure
GadA / B	Glutaminsäuredecarboxylasen
GadC	Glutamat / GABA-Antiporter
GDAR	Glutaminsäure-abhängige Säureresistenzsystem
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H-NS	<i>Histone-like nucleoid structuring protein</i>
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HCL	Salzsäure
HdeA	<i>H (HNS-histone-like nucleoid structuring)-dependent expression A</i>
HO [•]	Hydroxylradikal
Hsp31	Hitzeschock-Protein 31
HTH	Helix-Turn-Helix

HtrA	High Temperature Requirement A
HU	<i>Bacterial histone-like protein</i>
IHF	<i>Integration host factor</i>
ind.	induziert
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kan^R	Kanamycinresistent
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LFTR	L/F-tRNA-Protein-Transferase
LB-Medium	Lysogeny-Broth
LDAR	Lysin-abhängige Säurebeständigkeitssystem
LdcI	Lysin-Decarboxylase
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
Lsg.	Lösung
MarR	Multiples Antibiotika Resistenz Repressor Protein
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MetAP	Methioninaminopeptidase
MgCl₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
MlrA	<i>MerR-like Regulator</i> (Helix-turn-helix (HTH) Transkriptionseguлятор)
MSP	<i>Membrane scaffold protein</i>
Na₂CO₃	Natriumcarbonat
Na₂HOP₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH₂PO₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Ndh	NADH-Dehydrogenase II
NH₄Cl	Ammoniumchlorid
NH₄SO₄	Ammoniumsulfat
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Nuo	NADH-Dehydrogenase I
O₂⁻	Superoxid
OD₅₇₈	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm
ODAR	Ornithin-abhängige Säurebeständigkeitssystem
Omp	<i>Outer Membrane Protein</i>
on	Over night / über Nacht
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
OxyR	<i>Hydrogen peroxide-inducible genes activator</i>
p.e.	Post-exponential
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	<i>Post synaptic density of 95 kDa, discs large and Zonula Occludens 1</i>
Peptiddeformylase	PDF
pEtN	Phosphoethanolamin
PGA	Poly-N-acetylglucosamin
pGpG	5'-phosphoguanilyl- (3'-5')-Guanosin
pH	<i>Potentia hydrogenii</i> , „Stärke des Wasserstoffs“, Maßzahl für die Wasserstoff-Ionen-Konzentration

pKa	Dissoziationskonstante (pH Wert, an dem Verhältnis Kation: zu Base gleich 1:1 ist)
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PotE	Ornithin / Putrescin-Antiporter
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCS	Reaktive Chlorspezies ('reactive chlorine species')
RNA	Ribonucleic acid
RNAP	RNA-Polymerase
RprA	RpoS Regulator RNA A
RSH	RelA / SpoT-homologe Proteine
RstA	<i>DNA-binding transcriptional regulator</i>
RT	Raumtemperatur
Sdh	Succinate-Dehydrogenase
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single Nukleotide Polymorphism)
SoxR	<i>Redox-sensitive transcriptional activator SoxR/S (SoxRS-System)</i>
SoxS	Regulatorisches Protein SoxS (SoxR/S-System)
SpeF	Ornithindecaboxylase Ornithin / Putrescin-Antiporter PotE
Std.	Stunden
SurA	Putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
TetR	Tetrazyklin Repressor Protein
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindestelle
TSS	<i>Transformation and storage solution</i>
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VmpA	Variable membrane protein A (heute als PdeT bezeichnet)
X-Gal	5-Bromo-4Chloro-3Indoxyl-β-D-Galaktopyranosid

V. ZUSAMMENFASSUNG

Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP fördert nahezu allgegenwärtig die Bildung von bakteriellen Biofilmen. Enzyme, die c-di-GMP synthetisieren und abbauen, werden durch verschiedene N-terminale Sensordomänen gesteuert (Hengge, 2009; Hengge et al., 2016; Povolotsky & Hengge, 2016). Hier wird eine neuartige Klasse von weit verbreiteten c-di-GMP-Phosphodiesterasen (PDEs) beschrieben und ihre fünf Vertreter in *E. coli* verglichen, die eine periplasmatische CSS-Domäne aufweisen, welche von zwei Transmembranregionen (TM1 und TM2) flankiert wird. C-terminal schließt sich eine cytoplasmatischen EAL-Domäne mit PDE-Aktivität an die TM2 an.

PdeC aus *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde bereits von Herbst (2018) als Modell der CSS-Domänen-PDE Familie charakterisiert. Durch DsbA/DsbB geförderte Disulfidbrückenbindung (DSB) in der CSS-Domäne wird die PDE-Aktivität gehemmt. Im Gegensatz dazu ist die freie Thiolform, in Abhängigkeit von der TM2 als Dimerisierungs-Domäne, enzymatisch aktiv. Darüber hinaus wird diese Form von den periplasmatischen Proteasen DegP und DegQ prozessiert. Dieser Schritt ist für die Aktivierung von PdeC nicht erforderlich, sondern leitet den Proteinabbau ein. Ein irreversibel aktiviertes TM2+EAL-Fragment wird generiert, dass durch weitere Proteolyse langsam entfernt wird (Herbst & Hengge, 2018).

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass eine Reduktion in der CSS-Domäne von PdeC zur der freien Thiolform die PDE-Aktivität der EAL-Domäne *in vitro* stimuliert. Zusammen mit den Daten von Herbst (2018) charakterisieren diese Ergebnisse die periplasmatische CSS-Domäne als eine neue sensorische Domäne, die die Aktivität der c-di-GMP-spezifischen PDE durch einen DSB/Thiol-Schaltmechanismus reguliert (Herbst et al., 2018).

Obwohl alle fünf CSS-Domänen-PDEs von *E. coli* K12 eine ähnliche Struktur aufweisen, könnten die Redox-Biochemie, Proteolyse und die Wirkung auf die PDE-Aktivität unterschiedlich sein. Auf Basis der PDE-Aktivität von Nicht-DSB-Varianten, die dem Abbau von DegP und DegQ unterliegen, wurden PdeB, PdeC und PdeG als aktivierbare PDEs (Abbau steigert die PDE-Aktivität) und PdeD und PdeN als nicht aktivierbare PDEs charakterisiert.

PdeN scheint, anders als PdeC, nicht über die DSB Ausbildung in der periplasmatischen CSS-Domäne reguliert und aktiviert zu werden. Nach erfolgter Proteinbiosynthese wird die Stabilität des Proteins über den N-Terminus reguliert. Bei sauren Wachstumsbedingungen wird PdeN vermutlich über eine geringere Proteolyse-Rate einer unbekannten Protease stabilisiert. Wird das Protein erfolgreich in die Membran eingelagert, kann es bedingt durch eine strukturelle DSB seine PDE-Aktivität entfalten.

Abhängig von dem vielseitigen Zusammenspiel von Expression, Redox-Kontrolle und Proteolyse reguliert die PDE-Aktivität die Produktion von Amyloid-Curli-Fasern und Cellulose, den Hauptbiofilm-Matrixpolymeren in *E. coli*. Hier könnten die fünf CSS-Domänen-PDEs ein Netzwerk zur Feinabstimmung ausbilden, das eine c-di-GMP-Homöostase bei unterschiedlichsten Redox-Bedingungen, denen *E. coli* während seines Lebenszyklus ausgesetzt wird, gewährleistet.

VI. SUMMARY

The nucleotide second messenger c-di-GMP nearly ubiquitously promotes bacterial biofilm formation, with enzymes that synthesize and degrade c-di-GMP being controlled by diverse N-terminal sensor domains (Hengge, 2009; Hengge et al., 2016; Povolotsky & Hengge, 2016). Here, a novel class of widely occurring c-di-GMP phosphodiesterases (PDEs) that feature a periplasmic CSS domain flanked by two transmembrane regions (TM1 and TM2) and followed by a cytoplasmic EAL domain with phosphodiesterase activity, are described and compared.

PdeC from *E. coli* has already been characterized by Herbst (2018) as a model of the CSS domain PDE family. DsbA/DsbB-promoted disulfide bond (DSB) formation in the CSS domain has been shown to inhibit PDE activity. In contrast, the free thiol form, depending on the TM2 as the dimerization domain, is enzymatically active. In addition, this form is processed by the periplasmic proteases DegP and DegQ. This step is not necessary for the activation of PdeC, but initiates protein degradation. An irreversibly activated TM2 + EAL fragment is generated, which is slowly removed by further proteolysis (Herbst & Hengge, 2018).

Here it was confirmed that the reduction to the free thiol form in the PdeC CSS-domain clearly stimulates the PDE activity of the EAL domain *in vitro*. Together with the data from Herbst (2018), these results characterize the periplasmic CSS domain as a new sensory domain that regulates the activity of the c-di-GMP specific PDE through a DSB / thiol switch (Herbst et al., 2018).

Although all five *E. coli* K12 CSS-domain PDEs have a similar structure, redox biochemistry, proteolysis the effect on PDE activity may differ. Based on the PDE activity of non-DSB variants, which are degraded by DegP and DegQ, PdeB, PdeC and PdeG were characterized as activatable PDEs (degradation increases PDE activity) and PdeD and PdeN as not activatable PDEs (protein degradation causes inactivation).

Unlike PdeC, PdeN does not seem to be regulated and activated via the DSB formation in the periplasmic CSS domain. After protein biosynthesis, the protein stability appears to be determined via its N-terminus. Under acidic growth conditions, PdeN is presumably stabilized through a lower proteolysis rate of an unknown protease. If the protein is embedded in the membrane, it can develop its PDE activity.

Depending on the versatile interplay of expression, redox control, and proteolysis, the PDE activity regulates the production of amyloid curli fibres and cellulose, i.e. major biofilm matrix polymers in *E. coli*. Here the five CSS-Domain-PDEs might act a fine-tuning mechanism to maintain a c-di-GMP homeostasis under certain redox conditions *E. coli* experiences during its live cycle.

1 EINLEITUNG

1.1 Von der Flüssigkultur zum Biofilm

Das Wachstum von Bakterien, wie *E. coli* in Flüssigkulturen ist inzwischen sehr detailliert untersucht. Hierfür werden Zellen in einem komplexen „Lysogeny-Broth“ (LB)-Medium bei einer konstanten Temperatur inkubiert und die Genexpression sowie die Wachstumsgeschwindigkeit dokumentiert. Die so genannten Wachstumskurven zeigen zu Beginn, also direkt nach der Beimpfung des Mediums, eine kurze Anlaufphase, in der sich die Zellen an die neue Umgebung anpassen. Nach einiger Zeit beginnt jedoch die exponentielle Wachstumsphase. Ab einer optischen Dichte bei einer definierten Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}) von ca. 0,3 verbrauchen die meisten Zellen die vorhandenen Ressourcen für die Synthese von Ribosomen, wodurch der Grundstein für schnelles Wachstum und Proliferation gelegt wird (Hengge, 2011a; Sezonov et al., 2007).

Versiegen mit der Zeit Kohlenstoff- und weitere Energiequellen, treten die Zellen in die post-exponentielle (p.e.) Wachstumsphase ein. Physiologisch äußert sich diese durch ein Art Hungerzustand (Ferenci, 2001; Traxler et al., 2011). In diesem wird die Expression spezifischer Gene für Transport und Verwertung von weiteren Kohlenstoffquellen initiiert (Ferenci, 2001; Hollands et al., 2007; Liu et al., 2005). Zusätzlich wird die Flagellenexpression stimuliert, die in der Ausbildung mehrerer Flagellen pro Zelle gipfelt. Die Bakterien sind nun beweglich und können aktiv nach „Nahrung“ suchen (Barembuch & Hengge, 2007; Liu et al., 2005; Zhao et al., 2007).

Werden die Energieressourcen zunehmend knapper, beginnt ab einer OD_{578} von 2,5 – 3 die stationäre Wachstumsphase (Sezonov et al., 2007) und die Genexpression ändert sich komplett. Auf Grund des Nährstoffmangels wird die generelle Stressantwort induziert (Hengge, 2011a). Die Expression von Genen, deren Produkte für die Verwertung weiterer Kohlenstoffquellen dienen, wird heruntergefahren. Die Zellen werden stressresistent und die Produktion von Biofilmmatrix-Komponenten beginnt (Kolter et al., 1993; Lange & Hengge-Aronis, 1991; Notley & Ferenci, 1996; Notley-McRobb et al., 2002). Mit der stationären Wachstumsphase geht auch eine veränderte Morphologie der Zellen einher. Aus den charakteristisch stäbchenförmigen *E. coli* Zellen werden auf Grund von Zellteilung ohne weitere Produktion von Zellmasse kleine und runde Zellen (Hengge, 2011a).

Analog zu dem hier beschriebenen Wachstum in Flüssigkulturen würde das Wachstum auf einem festen Untergrund zu der Ausbildung eines Biofilms führen. Generell werden vier Biofilmen Typen beschrieben.

1. Der Biofilm, überschichtet von einer Flüssigkeit (*submerged*), kommt häufig in fließenden, aquatischen Habitaten vor. Er kann sich aber auch an Kathetern und in Pumpsystemen festsetzen.

2. Der pellikulare Biofilm (*pellical*) findet sich vor allem in stehenden Gewässern, aber auch in Entwässerungsanlagen für saures Bergbauwasser oder der traditionellen Essigproduktion.
3. Oberflächen-assoziierte Biofilme (*subaerial*) existieren an Steinen, Häusern oder Monumenten und
4. Makrokolonie-Biofilme wachsen häufig auf organischen Substraten wie dem Boden oder festen Nahrungsmitteln.

Alle diese beschriebenen Biofilmvarianten lassen sich durch unterschiedliche experimentelle Versuchsansätze simulieren und separat untersuchen (Serra & Hengge, 2014).

1.2 Regulationsmechanismen in *Escherichia coli*

Eine Vielzahl von Umwelteinflüssen wirkt sich auf das Wachstum und Überleben der Bakterien in ihrer natürlichen Umgebung aus. Dazu gehört nicht nur das Nährstoffangebot, sondern auch das Vorhandensein von ausreichend Sauerstoff und Licht, ein Wachstums-fördernder pH-Wert und weitere Faktoren. Diese werden über verschiedene Sensordomänen wahrgenommen und über ein komplexes, regulatorisches Netzwerk verarbeitet. So passen Bakterien ihre Genexpression, Proteinaktivität und Proteolyse an die jeweiligen vorherrschenden Umweltbedingungen an und trotzen widrigen Bedingungen. Obwohl einige Prozesse der Signalintegration von Umwelteinflüssen in *E. coli* noch unvollständig erforscht sind, haben sich Zweikomponentensysteme als weit verbreitete Form der Signaltransduktion von Umweltreizen herauskristallisiert. Hierbei führt die Bindung eines Liganden an die spezifische Sensordomäne eines Proteins zur Übertragung des Signals durch eine Transmitterdomäne auf einen intrazellulären Empfänger, dem 'Response'-Regulator. Dieser beeinflusst die Genexpression oder Proteinaktivität über Sigma-Faktoren, Transkriptionsfaktoren (TFs) oder andere sekundäre Botenstoffe (Stock & Da Re, 2000).

1.2.1 Sigmafaktoren

Der komplexe Prozess der RNA-Synthese und dessen Kontrolle ist seit vielen Jahrzehnten Teil intensiver Forschung. Ein Großteil der Erkenntnisse rund um den Transkriptionsprozess beruht auf Untersuchungen in Bakterien wie *E. coli* und *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Die *E. coli*-DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) ist für die gesamte bakterielle RNA-Synthese verantwortlich. Diese Multi-Untereinheiten-Polymerase besteht aus einem Kern-Enzym mit einer Zusammensetzung der Untereinheiten $\alpha\beta\beta'\omega$ und ist für die Elongation und Termination der Transkription verantwortlich. Eine zusätzliche Untereinheit, genannt Sigma (σ), kann sich mit der RNAP zu einem Holoenzym verbinden. Der Sigma-Faktor ermöglicht die spezifische Erkennung einer Promotorregion auf der DNA und eine effiziente Initiation der Transkription. In Abhängigkeit von unterschiedlichen Umweltbedingungen werden spezialisierte Sigma-Faktoren benötigt. Diese binden, unter Berücksichtigung der jeweiligen Umweltbedingungen, an die geeigneten Promotoren von Genen. Der bereits im Jahr 1968 entdeckte aktive

„Haushalts“-Sigma-Faktor, σ^{70} (RpoD) (Burgess et al., 1969) sorgt für die Aktivität essentieller Gene für Stoffwechsel- und Signalwege. Mittlerweile sind sechs weitere alternative Sigma-Faktoren bekannt, die bei unterschiedlichsten Bedingungen aktiviert werden (Helmann, 1999; Lonetto et al., 1992; Wösten, 1998):

- σ^{54} (RpoN): Stickstoffmangel
- σ^{38} (RpoS): generelle Stressantwort
- σ^{32} (RpoH): Hitzestress
- σ^{28} (RpoF): Flagellenexpression
- σ^{24} (RpoE): Zellhüllenstress
- σ^{18} (FecI): Eisentransport.

Die Regulation der Transkription wird durch eine Konkurrenz der Sigma-Faktoren um eine limitierte Anzahl von RNAP erreicht (Ishihama, 2000). Sicherlich spielen sich ändernde Level von Sigma-Faktoren eine Schlüsselrolle während des Wachstums von Bakterien. Für eine zusätzliche Regulation des Transkriptionsprozesses stehen spezifische Transkriptionsaktivatoren (Vicente et al., 1999), Sigma-Faktor-bindende Anti-Sigma-Faktoren (Helmann, 1999; Hughes & Mathee, 1998; Ishihama, 2000; Severinov, 2000) und sogar kleine RNAs (Wassarman & Storz, 2000) zur Verfügung.

1.2.2 Transkriptionsfaktoren

In *E. coli* können beinahe 100 TFs die Expression spezifischer Gene durch intermolekulare Kontakte mit der DNA und den Untereinheiten der RNAP modifizieren. Zusätzlich zu den dedizierten/zweckbestimmten TFs, von denen die meisten in vergleichsweise geringer Anzahl vorhanden sind, tragen auch Mitglieder der Klasse der reichlich vorhandenen DNA-Bindeproteine (IHF, Fis, HU, H-NS, uvm.) zur Regulation des Transkriptionsprozesses bei. Durch Bindeproteine kann die Architektur vieler regulatorischer DNA-Regionen so verändert werden, dass im dreidimensionalen Raum DNA-Sequenzen zusammengeführt werden, die sonst nicht so nahe beieinander wären (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1997).

TFs werden, basierend auf Ihrer Domänenarchitektur mehreren Familien zugeordnet. Die Zusammensetzung der Domänen ermöglicht es ihnen als regulatorische Schalter zu fungieren. Eine Domäne dient als Signalsensor für die Bindung des Liganden oder eine Protein-Protein-Wechselwirkung. In vielen Fällen ist der Ligand ein Metabolit oder ein physikochemisches Signal aus der Umwelt (Martínez-Antonio et al., 2006; Pérez-Martín & de Lorenzo, 1997). Die andere Domäne ist das reagierende Element des Schalters, das direkt mit einer Ziel-DNA-Sequenz oder der Transkriptionsfaktorbindestelle (TFBS) interagiert. In Bakterien ist die Helix-Turn-Helix (HTH)-Domäne am weitesten verbreitet (Madan Babu & Teichmann, 2003; Seshasayee et al., 2006). Mit Ausnahme von Systemen, die aus zwei Komponenten bestehen, sind die meisten regulatorischen Domänen in einem einzigen Protein vereint (Ulrich et al., 2005). Wenn das Sensorprotein des Zweikomponentensystems, üblicherweise im Periplasma der Zelle lokalisiert, einen sich ändernden exogenen Zustand

wahrnimmt, phosphoryliert es sich und seinen cytoplasmatischen Partner selbst, wobei nur letzterer die Fähigkeit zur Regulation der Transkription ausweist (Mascher et al., 2006). Zweikomponentensysteme arbeiten als Einheit und sind in *E. coli* häufig in einem Operon lokalisiert (Janga et al., 2007).

1.2.3 Bis-(3',5')-zyklisches di-Guanosin-Monophosphat - c-di-GMP

Die Fähigkeit, veränderte Umweltbedingungen zu erkennen und darauf zu antworten, ist für zelluläre Lebensformen überlebenswichtig. Aus evolutionärer Sicht war in diesem Zusammenhang die Entwicklung eines Systems zur Übertragung von Signalen durch Sigma- und Transkriptionsfaktoren (TF) oder durch kleine Signalmoleküle sehr bedeutsam. Insbesondere die kleinen Signalmoleküle, auch sekundäre Botenstoffe genannt, sind weit verbreitet und an der Regulation der Transkription, der Interaktion von Proteinen und deren Aktivität maßgeblich beteiligt. An der Bildung von *E. coli* Biofilmen ist hier aber vor allem das Bis-(3',5')-zyklisches di-Guanosin-Monophosphat (c-di-GMP) zu nennen.

Moshe Benziman's Arbeitsgruppe beschrieb im Jahr 1987 das erste Mal c-di-GMP als ungewöhnlichen Aktivator, der in der Lage war, die Cellulose-Synthese von *Komagataeibacter xylinus* zu stimulieren (Ross et al., 1987). Strukturell besitzt das c-di-GMP Monomer eine Zweifachsymmetrie, bei dem zwei GMP-Reste über einen 5'-3'-makrozyklischen Ring fusioniert sind. Hochauflösende Strukturaufnahmen von haben gezeigt, dass es in Lösung oder Protein-gebunden sowohl als verlängertes Monomer, als auch kondensiert, als interkalierendes Dimer vorkommen kann (Ross et al., 1987) .

Im letzten Jahrzehnt hat sich c-di-GMP als nahezu allgegenwärtiger bakterieller, sekundärer Botenstoff herausgestellt (Hengge et al., 2016; Hengge et al., 2019; Jenal & Malone, 2006; Römling et al., 2013). In vielen Bakterien fördert c-di-GMP die Biofilmbildung, in dem es die Synthese von Komponenten einer Biofilm-Matrix, bestehend aus amyloiden Fasern oder Exopolysacchariden, die Expression von Adhäsinen und andere Biofilm-relevante Funktionen stimuliert. In *E. coli* inhibiert c-di-GMP auch die Expression und/oder die Aktivität von Flagellen (Hengge et al., 2019; Pesavento et al., 2008).

Die zellulären Konzentrationen an c-di-GMP werden als Antwort auf interne, aber auch auf umweltbedingte Reize reguliert. An dieser Regulation sind zwei antagonistisch wirkende Proteinfamilien beteiligt: Diguanylat-Zyklasen (DGCs) und Phosphodiesterasen (PDEs). Vertreter dieser beiden Familien repräsentieren zwei der größten und bekanntesten Familien im Bereich der bakteriellen Signalproteine (Römling et al., 2013) und werden in allen großen bakteriellen Phyla gefunden. Die Synthese von c-di-GMP wird durch die Aktivität einer katalytischen GGDEF-Domäne ermöglicht. Namensgebend für die Domäne ist hier das konservierte Aminosäuremotiv Gly-Gly-Asp-Glu-Phe, das gleichzeitig das aktive Zentrum der katalytischen Einheit der DGCs bildet und der GTP-Bindung dient. An der c-di-GMP Synthese sind zwei antiparallel orientierte DGC-Dimere mit jeweils einem GTP Molekül beteiligt, wobei der Kontakt dieser DGCs hauptsächlich über das Produkt c-di-GMP vermittelt wird (Chan et

al., 2004). Mögliche Interaktionen von weiteren Proteindomänen in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltreizen können ebenfalls zur Dimerisierung zweier GGDEF-Domänen-Proteine beitragen (Jenal et al., 2017). Neben dem aktiven Zentrum besitzen die DGCs stromaufwärts ein weiteres konserviertes, aus vier Aminosäuren bestehendes RxxD-Motiv, wobei das „x“ für jede beliebige Aminosäure stehen kann. Eine Bindung von c-di-GMP an dieser Stelle hat eine allosterische Inhibierung zur Folge und ermöglicht eine Autoregulation der Enzymaktivität (Chan et al., 2004).

C-di-GMP wird über strukturell und mechanistisch unterschiedliche c-di-GMP-spezifische PDEs abgebaut. Diese besitzen entweder eine konservierte EAL- oder HD-GYP-Domäne. Die PDEs mit katalytischer EAL-Domäne hydrolisieren c-di-GMP in Gegenwart von Mg^{2+} oder Mn^{2+} Ionen zum linearen 5'-phosphoguanylyl-(3'-5')-Guanosin (pGpG) (Christen et al., 2005).

PDEs mit EAL-Domäne sind häufig als Dimere aktiv, aber im Gegensatz zu DGCs, bei denen die Fusion von zwei GTP-Molekülen eine dimere Anordnung des Enzyms erfordert, scheint diese quaternäre Anordnung für die PDE-Katalyse nicht erforderlich zu sein (Barends et al., 2009). Stattdessen zeigen strukturelle Untersuchungen eine regulatorische Rolle für die EAL-Domänen-Dimerisierung. Basierend auf der Analyse von Kristallstrukturen wird ein muschelartiger Öffnungs- und Schließmechanismus des EAL-Dimers vorgeschlagen, der die Aktivität der PDEs reguliert (Sundriyal et al., 2014; Winkler et al., 2014).

Die zweite, nicht-verwandte Familie der c-di-GMP spezifischen PDEs besitzt eine konservierte HD-GYP-Domäne. Die Analyse der Kristallstruktur ergibt eine neuartige dreikernige Bindungsstelle für Eisen, das an der Katalyse beteiligt ist. Während EAL-basierte Enzyme im Allgemeinen c-di-GMP in das lineare Produkt pGpG umwandeln, hydrolisieren HD-GYP-Domänen c-di-GMP in einer einstufigen Reaktion zu zwei Molekülen GMP (Bellini et al., 2014).

1.3 Säureresistenz in *Escherichia coli*

Das Darmbakterium *E. coli* hat die bemerkenswerte und teilweise sehr gut untersuchte Fähigkeit, bei extrem niedrigen pH-Werten zu überleben. Diese Eigenschaft geht mit einer Aktivierung von diversen Mechanismen der Säureresistenz einher, die oft verschieden und sehr komplex reguliert werden. Die Resistenz gegenüber niedrigen pH-Werten ist auch ein wichtiger Pathogenitätsfaktor. Dieser ermöglicht *E. coli* die Passage durch die saure Umgebung des Magens zu überstehen, um im Darm trotz sehr geringer infektiöser Dosen seine Pathogenität zu entfalten (De Biase & Lund, 2015).

Die Mechanismen, die es *E. coli* ermöglichen, in den menschlichen Darm vorzudringen sind vielseitig und sehr komplex. Der Darm ist eine sehr dynamische Umgebung, in der einzelne pH-Werte in Abhängigkeit vom jeweiligen Abschnitt des Verdauungstraktes, dem Verdauungszustand der Nahrung und dem Alter bzw. der Gesundheit des Individuums stark variieren (Fallingborg, 1999). Während der Darmpassage sind Bakterien unterschiedlichen Säuren ausgesetzt, von denen einige als Teil des Verdauungsprozesses, andere durch Kommensalen im Darm produziert werden. Sie unterscheiden sich in ihren Effekten in

Abhängigkeit von ihrer chemischen Natur und dem jeweiligen pKa-Wert (De Biase & Lund, 2015).

Per Definition von Gordon & Small aus dem Jahr 1993 dient der Prozentsatz eines Inokulums, dass für zwei Stunden einen pH von 2,5 übersteht, als Maß für die Säureresistenz. Stämme, von denen unter diesen Bedingungen mehr als 10 % des Inokulums überleben, werden als säureresistent bezeichnet (Gordon & Small, 1993). Häufig wird die Säureresistenz als Eigenschaft der stationären Wachstumsphase der Bakterienzellen bezeichnet, da sich die Zellen bei Eintritt in den menschlichen Wirt häufig in dieser Wachstumsphase befinden. Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die Säureresistenz nicht auf einzelne Wachstumsphasen beschränkt ist, sondern auch bei exponentiell wachsenden Zellen vorhanden ist, die in schwach saurem Medium herangewachsen sind (Small et al., 1994).

Die Gattung *E. coli* umfasst eine große Zahl heterogener Stämme mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften und Fähigkeiten (Kaper, 2005). Diese sind einerseits stark von der jeweiligen Umgebung abhängig, wie das Wachstum in einem Biofilm, oder planktonisch und unter aeroben oder anaeroben Bedingungen, andererseits aber auch von den vorangegangenen Wachstumsbedingungen, wie bspw. vorheriges Wachstum unter Säurestress. Die Vertreter der Gattung *E. coli* besitzen damit eine hervorragende Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Umweltbedingungen.

1.3.1 Auswirkungen von niedrigen pH-Werten auf die Bakterienzelle

Niedrige pH-Werte beeinflussen in *E. coli* einerseits Art und Häufigkeit der zellulären Komponenten wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren, andererseits aber auch zelluläre Zustände wie bspw. das Ausmaß der Antriebskraft für einen Protonentransfer (*proton-motive force*) oder die Entkopplung der Atmungskette. Die Konsequenzen der einzelnen Effekte in Experimenten nachzuweisen ist schwierig. Entscheidend ist, dass starke Säuren, die pH-Werte bis hin zu annähernd 5 in der Umgebung erreichen, das Periplasma sehr schnell auf das Niveau des externen Mediums angleichen. Das Cytoplasma hingegen wird nur transient sauer, bevor es wieder zu seinem normalem pH-Wert von 7.4 zurückkehrt (Wilks & Slonczewski, 2007). Starke Säuren können sehr effektiv und komplett ionisiert werden und die innere Membran stellt eine stabile Barriere gegenüber Protonen dar. Hinzu kommt, dass das Cytoplasma mit einer hohen Pufferkapazität ausgestattet ist, die es ermöglicht kleinen pH-Wert Änderungen zu trotzen und das Membranpotential im pH-Wert-Bereich zwischen 5-9 konstant zu halten. Ein nicht unerheblicher Teil der Säureresistenz-Mechanismen muss sich deshalb auf den Schutz der empfindlichen zellulären Kompartimente im Periplasma beziehen (Gayen et al., 2019). Bei sehr niedrigen pH-Werten bricht auch die Barriere der inneren Membran zusammen und das Cytoplasma säuert sich an. Auch hier reduzieren effektive, spezifische Säureresistenz-Mechanismen den pH-Wert des Zytoplasmas durch einen effektiven Transport von Protonen nach außen (Richard & Foster, 2004; Tsai & Miller, 2013;

Tsai et al., 2013). In Abwesenheit dieser Systeme kann der pH-Wert des Zytoplasmas unter pH 4 fallen, was die meisten Zellen nicht überleben werden.

Auf schwache organische Säuren, wie Acetat/Essigsäure und Propionat/Propionsäure im Gastrointestinaltrakt reagiert *E. coli* anders. Per Definition sind schwache Säuren an ihrem pKa-Wert nur zu 50 % ionisiert. Die nicht-ionisierten Formen sind sehr weit verbreitet und können, besonders bei niedrigen pH-Werten, passiv die Zellmembran durchdringen. Im Cytoplasma, mit einem deutlich höheren pH-Wert (7,4), neigen die schwachen organischen Säuren zur Dissoziation. Es entsteht ein potentiell zelltoxisches Säureanion. Die freiwerdenden Protonen verursachen Säurestress und zeitgleich reduziert sich die Protonentreibende Kraft über die zytoplasmatische Membran. Die dissoziierten Anionen können sich mit Protonen verbinden, die durch die Atmungskette produziert wurden, ermöglichen einen Transport über die innere Membran und wirken als klassischer Entkoppler (Axe & Bailey, 1995). Aufgrund der Entkopplung der Atmungskette eignen sich diese organischen Säuren zur Lebensmittelkonservierung und als Desinfektionsmittel (Roe et al., 2002; Salmond et al., 1984). Darüber hinaus dienen sie als Signalmoleküle, die *E. coli* zur „Orientierung“ verwendet, um seine Position im Gastrointestinaltrakt zu bestimmen (De Biase & Lund, 2015).

1.3.2 Säureresistenzmechanismen in *Escherichia coli*

E. coli nutzt eine Kombination aus passiven und aktiven Systemen, um eine Säureresistenz zu erzeugen und Säurestress zu vermeiden. Das passive System stützt sich auf die Pufferkapazität von cytoplasmatischen Aminosäuren, Proteinen, Polyaminen, Polyphosphaten und anorganischen Phosphaten. Zusammen summiert sich das auf eine Pufferkapazität von 50 bis 200 mM pro pH-Einheit (Slonczewski et al., 2009). Das aktive System setzt sich aus physiologischen, metabolischen und Protonen-bindenden Systemen zusammen (vergl. Abb. 1).

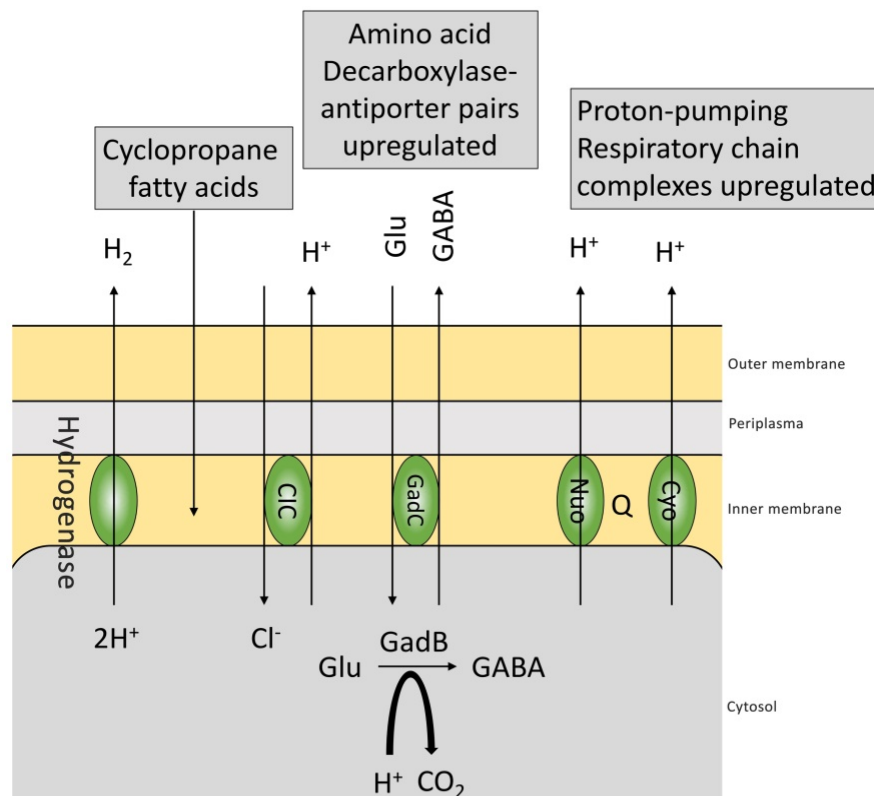


Abb. 1: Säureresistenzmechanismen in *E. coli*

Schematische Darstellung der strukturellen Komponenten des Säureresistenz-Systems. Das Glutamat-abhängige System steht beispielhaft für weitere Aminosäure-Antiporter für Arg, Lys und Gln. Der Antiporter und eine Decarboxylase sind die strukturellen Komponenten jedes Systems mit Ausnahme des Glutamin-abhängigen Systems, das denselben Antiporter (GadC) wie das Glutamat-abhängige System benutzt. Weitere Säuretoleranzmechanismen werden über Hydrogenasen und Protonen-Pumper erreicht. GABA, γ -Aminobuttersäure; GadB, Glutamatdecarboxylase- β ; GadC, Glutamat / γ -Aminobutyrat-Antiporter; Nuo, NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase.

Als physiologische Adaption gegenüber Säurestress wird bspw. die Veränderung der Membran-Fluidität durch Reduktion des Anteils ungesättigter Fettsäuren unter Zunahme des Anteils an Cyclopropan-Fettsäuren bezeichnet (Chang & Cronan, 1999; Yuk & Marshall, 2004). In *E. coli* erhöht eine Cyclopropan-Fettsäuresynthese neben der Säure- auch eine Hitze- und Druck-Resistenz im Vergleich zu Cyclopropan Fettsäure-freien Mutanten (Chen & Gänzle, 2016).

Vor einiger Zeit wurde das Protein HdeA (HNS-histone-like nucleoid structuring-dependent expression A) entdeckt, ein periplasmatisches Protein mit einer Größe von 9 kDa, das als ein wesentlicher Bestandteil den Säureresistenz-Mechanismus im *E. coli* Periplasma unterstützt. Es wird auch als Chaperon beschrieben, weil es Säure-denaturierten Substraten eine erneute Löslichkeit vermittelt und die Aggregation mehrerer periplasmatischer Proteine bei einem niedrigen pH-Wert unterdrückt. Möglicherweise agiert HdeA zusammen mit einem zweiten Protein, HdeB, das vom selben Operon stammt. Die Expression beider Proteine wird als Antwort auf einen niedrigen pH-Wert induziert (Goemans et al., 2014).

Als Gegenstück zu HdeA und HdeB fungiert im Cytoplasma vor allem das Hitzeschock-Protein (Hsp31) Chaperon als Stabilisator für entfaltete Zwischenprodukte bei Säurestress (Mujacic & Baneyx, 2007). Eine ähnliche Schutzfunktion hat auch das DNA-Binde-Protein aus hungernden Zellen (Dps) gegenüber der DNA. Dps schirmt die DNA gegenüber Fe^{2+} -Ionen ab und verhindert somit die schädliche Wirkung von Hydroxylradikalen über die Fenton-Reaktion (Grant et al., 1998).

Transkriptionsanalysen in *E. coli* während des Wachstums unter leicht sauren Bedingungen (pH 5.0 – 5,7) haben metabolische Veränderungen gezeigt, die Schutz vor Säurestress bieten. Beobachtet wird eine höhere Aktivität von Genen, die für Komponenten der Elektronentransportkette codieren. Hierzu gehören die Cytochrom- b_0 -Oxidase (*cyo* Gene), die NADH-Dehydrogenase II (*ndh* Gene), die Succinate-Dehydrogenase (*sdh* Gene) und die NADH-Dehydrogenase I (*nuo* Gene). Unter normalen Wachstumsbedingungen erhalten diese Systeme die Protonen-treibende Kraft, die mit dem direkten oder indirekten Export von Protonen aus der Zelle gekoppelt ist. Da auch diese Systeme bei milder Säurebelastung hochreguliert werden, erhöht sich unter diesen Bedingungen die Transportrate von Protonen im Vergleich zu normalen Wachstumsbedingungen (Hayes et al., 2006; Maurer et al., 2005). Der intrazelluläre pH-Wert wird somit über den direkten und aktiven Transport von Protonen nach außen eingestellt (Kanjee & Houry, 2013). Die Mechanismen der Säureresistenz, die mit einem erhöhten Protonentransport einhergehen, werden in zwei Hauptklassen unterteilt: Die Wasserstoff-produzierenden Formiat-Wasserstoff-Lyase (FHL)-Komplexe und das Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-abhängige Aminosäure-Decarboxylase Säureresistenzsystem.

Anaerobes Wachstum unter starker Azidität induziert den Ni^{2+} -abhängigen Hydrogenase-3-Komplex (HycBCDEFG), der Protonen zu Wasserstoffgas reduziert. Die zur Reduktion von H^+ benötigten Elektronen stammen aus der Oxidation von Formiat durch die Dehydrogenase-H, die zusammen mit der Hydrogenase-3 den FHL-Komplex bildet. Dieser wandelt Formiat in CO_2 und H_2 um und gewährleistet so das Leben unter anaeroben Bedingungen und extremem Säurestress (Hayes et al., 2006; Noguchi et al., 2010).

Vier verschiedene Aminosäurerest (AR)-abhängige Systeme wurden charakterisiert und jedes davon hat zwei unterschiedliche Komponenten: (1) Eine cytoplasmatische Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Decarboxylase, die eine Protonen-abhängige Decarboxylation einer Substrat-Aminosäure zu einem Produkt und CO_2 katalysiert und (2) einen, in der inneren Membran sitzenden, Substrat/Produkt Antiporter, der den Ablauf durch den Austausch von externem Substrat für das interne Produkt erleichtert (Foster, 2004) (Abb. 1) AR-systeme mit einem vergleichbaren Mechanismus sind das

- Glutaminsäure-abhängige Säureresistenzsystem (GDAR), das aus den Glutaminsäure-Decarboxylasen GadA/GadB und dem Glutamat / γ -Aminobuttersäure (GABA)-Antiporter (GadC) besteht (Xu et al., 2019);
- das Arginin-abhängige Säure-Resistenz-System (ADAR), bestehend aus der induzierbaren Arginin-Decarboxylase (AdiA) und dem Arginin-Antiporter (AdiC);

- das Lysin-abhängige Säurebeständigkeitssystem (LDAR), bestehend aus der induzierbaren Lysin-Decarboxylase (LdcI) und dem Lysin / Cadaverin-Antiporter (CadB); und
- das Ornithin-abhängige Säurebeständigkeitssystem (ODAR), bestehend aus der induzierbaren Ornithin-decarboxylase (SpeF) und dem Ornithin / Putrescin-Antiporter (PotE) (Kanjee et al., 2011).

1.4 Das Disulfidbrücken-generierende System in *Escherichia coli*

E. coli kann als fakultativ anaerober Organismus in sauerstoffreichen Umgebungen wachsen. Es ist auch in der Lage, seinen Stoffwechsel über Gärungsprozesse so umzustellen, dass ein Wachstum unter Sauerstoff-ärmeren Bedingungen möglich ist.

Wie bereits in Kapitel 1.3.1 für die Auswirkungen niedriger pH-Werte auf die Bakterienzelle beschrieben, neigt das bakterielle Periplasma dazu, sich sehr schnell an die extrazellulären Umweltbedingungen anzupassen. Dies gilt natürlich nicht nur für pH-Werte der Umgebung, sondern auch für weitere Umweltfaktoren wie bspw. Sauerstoffverfügbarkeit und Lichtexposition. Viele dieser Umwelteinflüsse wirken sich auch auf die Redox-Zustände der periplasmatischen Proteine aus. Interessant wird dieser Aspekt vor allem für die Disulfidbrücken (DSBs), die durch Thiolgruppen von Cysteinen über oxidative Reaktionen gebildet werden. Proteine, die DSBs enthalten, können allgemein in stabile und nicht-stabile DSBs klassifiziert werden. Stabile DSBs spielen häufig bei der Proteinfaltung eine signifikante Rolle und sorgen durch die entstehenden Bindungen für Stabilität des nativen Zustands. Für die nicht-stabilen DSBs kann der Wechsel zwischen Thiol-Oxidation und DSB-Reduktion wie im Beispiel von OxyR von zentraler Bedeutung für die Aktivierung und Deaktivierung eines Proteins sein (Landeta et al., 2018). Insofern ist es für Bakterien von großer Bedeutung, diese Effekte und Auswirkungen von sich stets ändernden Umweltbedingungen und ihre Auswirkungen auf die Redox-Zustände der periplasmatischen Proteine über spezifische Mechanismen zu kontrollieren und zu regulieren. Das wohl bekannteste System, das dieser Aufgabe gerecht wird, ist das Disulfidbrücken-generierende-System (DSB-System) aus *E. coli*.

Die Ausbildung von DSBs in Proteinen ist eine oxidative Reaktion, die entscheidend für die Faltung und Reifung vieler cytosolischer, sekretierter und Membran-ständiger Proteine ist. Das am besten charakterisierte System zur Beschleunigung dieser oxidativen Reaktion ist das DSB-System in *E. coli* (Abb. 2). Ähnliche katalytische Systeme werden aber auch für einer Vielzahl anderer Organismen beschrieben (Heras et al., 2007; Sevier & Kaiser, 2002; Sevier & Kaiser, 2006; Thorpe & Coppock, 2007).

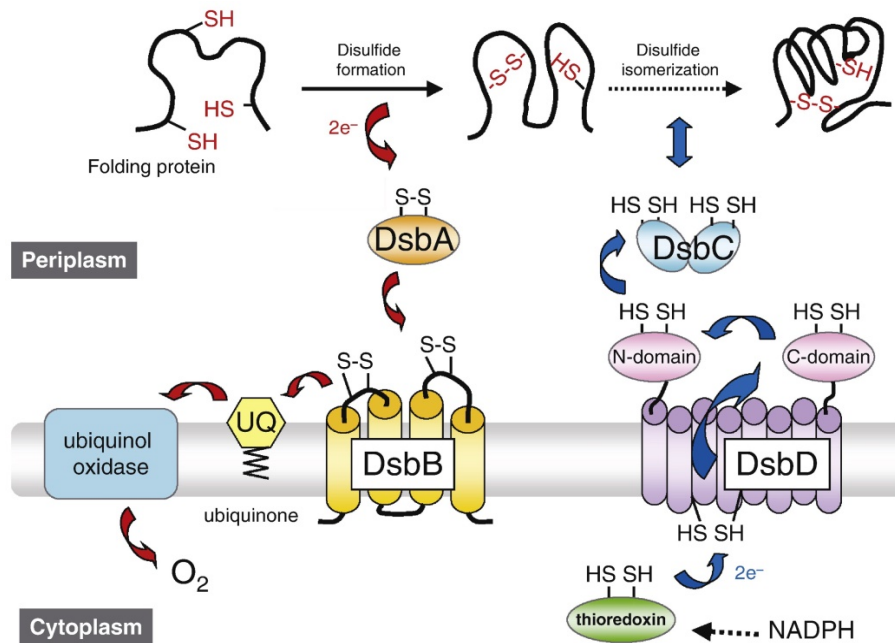


Abb. 2: Das DSB-System in *E. coli*

Proteine werden nach ihrer Translation im Cytoplasma über verschiedene Transportsysteme in das Periplasma überführt. Hier werden die noch nicht gefalteten Proteine über DsbA oxidiert und bilden DSBs aus. Die Elektronen des Substrats überträgt DsbA auf das Membranprotein DsbB. Von dort werden die Elektronen über Ubiquinone bspw. in die Atmungskette eingespeist. Nicht-native DSBs können wiederum durch DsbC reduziert und korrigiert werden. Die Reduktion von DsbC erfolgt über das Membranprotein DsbD. Die dafür notwendigen Elektronen stammen aus dem Thioredoxin-System im Cytoplasma. DsbA und DsbB bilden demnach einen DSB-bildenden und DsbC und DsbD einen DSB-isomerisierenden Reaktionsweg (Inaba & Ito, 2008).

In diesem System ist DsbA der primäre DSB-Elektronendonator im Periplasma und katalysiert das Entstehen von DSBs manchmal willkürlich, aber auch Entropie-abhängig von sich faltenden Proteinen (Bardwell et al., 1991; Kamitani et al., 1992; Yazawa & Furusawa, 2019). DsbB ist ein cytoplasmatisches Membranprotein, das eine zentrale Rolle in diesem oxidativen System spielt, in dem es in Verbindung mit gebundenem Ubiquinon DSBs *de novo* generiert und dann weiter zu DsbA transferiert (Bader et al., 1999; Kobayashi et al., 1997). Zusätzlich findet im periplasmatischen Raum der *E. coli* Zelle ein weiterer Disulfid-isomerisierender Weg statt, an dem DsbC als wesentliche Proteindisulfidisomerase beteiligt ist (Sone et al., 1997). Das cytoplasmatische Membranprotein DsbD hält hierbei DsbC in einem reduzierten Zustand, in dem es Elektronen vom Thioredoxin im Cytosol zu DsbC im Periplasma transferiert (Missiakas et al., 1995; Rietsch et al., 1997).

1.5 Die Familie der *High Temperature Requirement A* Proteasen

Die Familie der 'High Temperature Requirement A' (HtrA) Proteasen ist weit verbreitet und wird von einer Vielzahl von Mikroorganismen, wie Archaeen, Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien exprimiert. Ihre Hauptaufgabe ist die Kontrolle der Qualität der zellulären Protein-Komponenten, indem sie schwere zelluläre Fehlfunktionen verhindern. Diese können aufgrund der Akkumulation von fragmentierten, falsch lokalisierten oder falsch gefalteten

Proteinen entstehen (unter physiologischen aber auch Stressbedingungen) (Backert et al., 2018). Obwohl die Aminosäuresequenz der HtrA Proteasen hoch konserviert ist, kann sich dennoch die Domänen-Architektur deutlich unterscheiden. In *E. coli* gelten die drei homologen Proteasen DegP, DegQ und DegS als Paradigma der HtrA Funktion in Gram-negativen Bakterien (Waller & Sauer, 1996). Die Proteasen DegP und DegQ besitzen ein N-terminales Signalpeptid, das an der Translokalisierung des Proteins ins Periplasma beteiligt ist. Gefolgt wird diese Domäne von einer konservierten Chymotrypsin-ähnlichen Serinprotease-Domäne, die aus einem katalytischen Drei-Bein mit Histidin-, Aspartat- und Serinresten besteht. Am C-Terminus befinden sich zwei PDZ-Domänen (*post synaptic density of 95 kDa, discs large and Zonula Occludens 1*), die an der Substraterkennung, Substratbindung und HtrA-Oligomerisierung beteiligt sind. Im Vergleich dazu besitzt die DegS-Protease ein N-terminal lokalisiertes Transmembransegment anstelle des Signalpeptids und nur eine PDZ-Domäne. DegS bildet eine trimäre Struktur im periplasmatischen Raum (Kim & Kim, 2005).

DegP ist ein bi-funktionelles Protein mit strikt regulierter Protease- und Chaperon-Aktivität. Es erleichtert sowohl die Degradation als auch die Neufaltung von falsch gefalteten periplasmatischen Proteinen. Da die Expression über RpoE reguliert wird, ermöglicht die konzentrierte Wirkung von DegP die Erkennung und Reduzierung von periplasmatischem Proteinfaltungs-Stress. Somit ist DegP verantwortlich für die Proteinhomeostase und trägt bspw. beim Wachstum mit erhöhten Temperaturen entscheidend zum Überleben unter Stressbedingungen bei (Hansen & Hilgenfeld, 2013; Lipinska et al., 1988). Unter „normalen“ Bedingungen beteiligt sich DegP am Transport von Membran-Proteinen aus dem Cytosol durch das Periplasma, bevor sie in die äußere Membran inserieren (Sawa et al., 2010). Die katalytische Aktivität von DegP aus *E. coli* kann in Abhängigkeit von der Bildung oligomerer Strukturen (Hexamere) nach Substratbindung reversibel ein- bzw. ausgeschaltet werden (Kim et al., 2011; Krojer et al., 2010). Konformationsänderungen führen zur Dissoziation eines Hexamers im Ruhezustand und zur nachfolgenden Anlagerung von Oligomeren höherer Ordnung, bestehend aus 12 oder 24 DegP Monomeren (Jiang et al., 2008; Krojer et al., 2008; Shen et al., 2009). Ebenfalls wird über die Substratbindung eine Umwandlung des inaktiven Trimers in ein aktives Trimer beobachtet (Kim & Sauer, 2012). In der Literatur werden bereits einige DegP Substrate beschrieben. In der Liste befinden sich bspw. falsch gefaltete Proteine des Maltose-Bindeproteins, der alkalische Phosphatase und der α -Amylase, aber auch native Proteine wie CpxP (*acylated precursor of colicin A lysis protein*).

Auch DegQ besitzt wie DegP eine duale Funktion als Chaperon und Protease und wird sowohl als strukturelles, als auch als funktionelle Homolog zu DegP verstanden (Kolmar et al., 1996; Waller & Sauer, 1996; Wrase et al., 2011). Beide Proteasen teilen sich die gleiche Domänenarchitektur und eine hohe Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz (~60 % in *E. coli*). Während in *E. coli* sowohl DegP als auch DegQ vorhanden sind, codieren viele Prokaryoten

nur das DegQ-Homolog. Dies unterstreicht die Bedeutung von DegQ für die Proteinhomeostase im Periplasma von *E. coli* (Kim & Kim, 2005; Onder et al., 2008).

1.6 Physiologie der Biofilmbildung in *Escherichia coli* K12

1.6.1 Das Konzept der Biofilmarchitektur

Biofilme sind Aggregate von mikrobiellen Zellen, die in einer selbst produzierten Matrix aus EPS eingebettet sind und aneinander bzw. auch an einer Oberfläche haften (Flemming & Wingender, 2010; Flemming et al., 2016; Hobley et al., 2015). Bezeichnend für diese bakterielle (Über-)Lebensform ist seine ausgeprägte Toleranz gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmitteln, was schwerwiegende medizinische und technische Probleme verursachen kann (Hall & Mah, 2017; Lewis, 2008). Biofilme bilden sich nicht rein zufällig, sondern folgen einem Prinzip, dem metabolische Stratifizierung und differentielle Expression bestimmter Gene in verschiedenen Biofilmzonen zu Grunde liegen. Diese Zonen folgen wahrscheinlich Gradienten von Nährstoffen und/oder Sauerstoff, die durch Diffusion und Verbrauch bestimmt werden (Serra & Hengge, 2014).

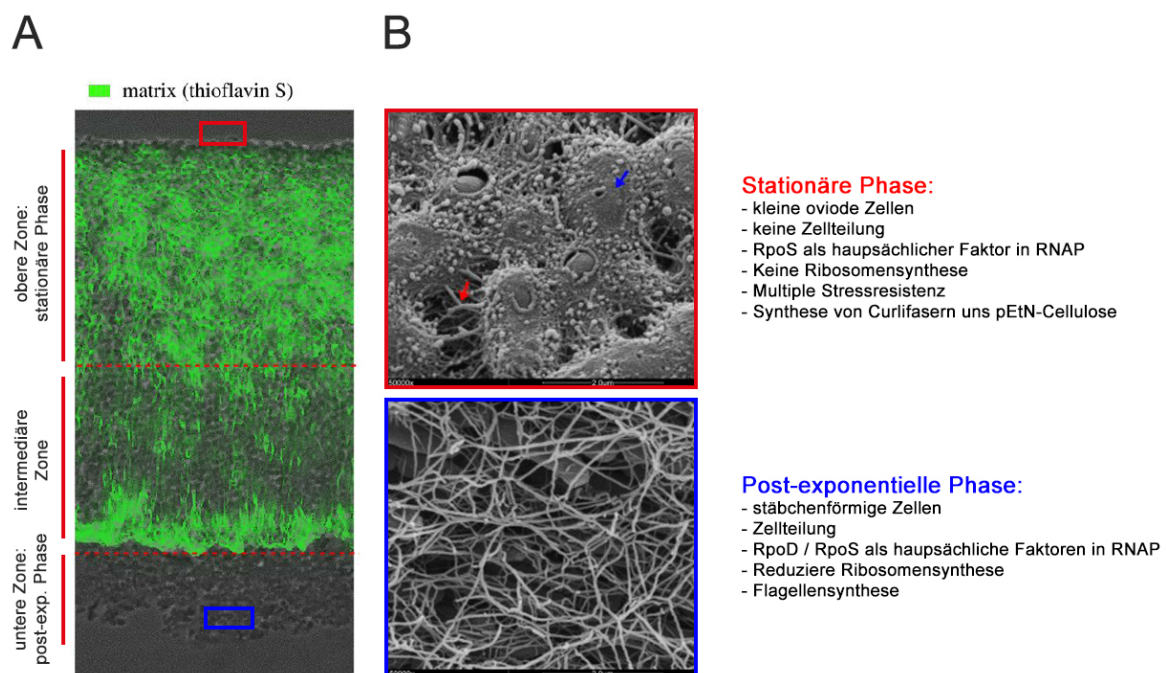


Abb. 3: Biofilmmatrixarchitektur in *E. coli*

(A) Gezeigt wird ein Querschnitt mit den verschiedenen Zonen einer AR3110 Makrokolonie. Die Matrix wurde über den Matrixfarbstoff Thioflavin S grün eingefärbt. Kleiner roter und blauer Kasten zeigen eine beispielhafte Struktur vergrößert in **(B)**. Dieser Teil der Abbildung wurde aus (Klauck et al., 2018) extrahiert. **(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme der oberen und unteren Zone einer AR3110 Makrokolonie. Oben liegen die kleinen, ovoiden Zellen, eingebettet in einer Matrix aus Curli-Fasern und Phosphoethanolamin (pEtN)-modifizierter Cellulose. Unten werden stäbchenförmige Zellen mit Flagellen gezeigt. Die Abbildungen A und B sind aus verschiedenen Quellen zusammengesetzt, dienen lediglich der Darstellung eines Sachverhalts und entstammen nicht aus einem zusammenhängenden Experiment. Dieser Teil der Abbildung wurde extrahiert aus (Serra et al., 2013a).

Diesem Konzept folgt auch die Matrixproduktion in *E. coli* (Abb. 3). Wächst dieser für längere Zeit auf einer Agarplatte mit Nährmedium wird im Querschnitt nicht nur eine Zonierung, sondern auch eine überzelluläre Architektur sichtbar. Die Matrix besteht aus amyloiden Curli-Fasern und Phosphoethanolamine (pEtN)-modifizierter Cellulose. Die genannte Modifizierung verleiht der Nanoverbundstruktur in derartigen Biofilmen makroskopische Kohäsion und Elastizität und ist mitverantwortlich für die zu beobachtenden Strukturen (Serra et al., 2013a; Serra et al., 2013b; Thongsomboon et al., 2018).

Die Expression der essentiellen Gene für die Produktion von pEtN-Cellulose und Curli-Fasern erfolgt in *E. coli* während der stationären Phase und ist abhängig vom Transkriptionsfaktor CsgD. Dieser ist wiederum abhängig von RpoS, einem Sigma-Faktor der generellen Stressantwort sowie dem sekundären Botenstoff c-di-GMP (vergl. Kapitel 1.6.2). Die Produktion von Curli-Fasern und pEtN-Cellulose in den oberen Schichten eines Makrokoloniebiofilms scheint daher eine Reflexion des Nährstoffgradienten zu sein, wobei Nährstoffe nur aus der Agarplatte unterhalb der Makrokolonie verwertet werden können (Serra et al., 2013a; Serra et al., 2013b). Diese Beobachtungen liegen im Einklang mit dem Vorhandensein von kleinen ovalen Zellen in der oberen Schicht der Makrokolonie, die ebenfalls charakteristisch für „hungrige“ Zellen in der stationären Wachstumsphase sind (Lange & Hengge-Aronis, 1991; Serra et al., 2013a; Serra et al., 2013b). In den Zellen der unteren Schichten wird hingegen keine Matrixproduktion beobachtet. Hier findet sich ein Netzwerk aus ineinander verschlungenen Flagellen, von denen bekannt ist, dass diese transient von post-exponentiell wachsenden *E. coli* Zellen produziert werden (Barembuch & Hengge, 2007; Lange & Hengge-Aronis, 1991; Serra et al., 2013b). Das Muster der differentiellen Matrixproduktion zeigt deutlich, dass nicht nur temporäre Änderungen der Genexpression während der Biofilmreifung eine Rolle spielen, sondern auch eine räumliche Kontrolle erfolgt. Diese steht in Bezug zum vorhandenen Nährstoffgradienten, der Wachstumsphase zur c-di-GMP-vermittelten Signaltransduktion (Serra et al., 2013a).

Studien haben gezeigt, dass die räumliche Kontrolle der Genexpression innerhalb von Makrokolonie-Biofilmen die gesamte Transkription beeinflusst. Daran sind verschiedene Sigma-Untereinheiten der RNAP, eine stringente Kontrolle der ribosomalen Genexpression und räumlich differenzierte c-di-GMP Signale beteiligt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das komplexe Muster der physiologischen Schichtung im Querschnitt der Makrokolonie ('long-range stratification') und die Heterogenität ('short-range heterogeneity') mit der globalen Genexpression und mit den unterschiedlichen Zonen der komplexen suprazellulären Matrixarchitektur korreliert. Die lokale Matrixheterogenität wird durch einen c-di-GMP-abhängigen molekularen Schalter gesteuert, in dem die Triggerphosphodiesterase PdeR die Schlüsselkomponente darstellt und in Kombination mit einer zweiten Komponente der Diguanylatcyclase DgcM wirkt. Diese lokale Heterogenität der Matrixproduktion ist entscheidend für die gewebeartige Elastizität, die für die Integrität des *E. coli*-Makrokolonie-Biofilms während der Faltenbildung in großem Maßstab erforderlich ist (Serra & Hengge, 2019). Folglich beruhen die physiologischen und biomechanischen Eigenschaften der

Matrixarchitektur von Biofilmen nicht nur auf der sich selbst organisierenden Struktur der EPS Moleküle, sondern auch auf dem räumlichen und zeitlichen Zusammenspiel der globalen Genregulation und den Mikro-Umweltbedingungen, die eine differentielle Matrixproduktion in den verschiedenen Biofilmzonen antreiben (Klauck et al., 2018; Okegbe et al., 2014; Serra & Hengge, 2019; Stewart & Franklin, 2008; Vlamakis et al., 2008).

1.6.2 Prinzipien der c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion

Da die vorhandenen Ressourcen während des Wachstums zumeist recht limitiert sind, können Bakterien nicht gleichzeitig ihre Proliferation und die generelle Stressantwort maximieren (Ferenci, 2001; Hengge, 2011a; Nyström, 2004). Auf molekularer Ebene spiegelt sich dieser Zustand über die limitierte Menge an RNAP-Kernenzym für die verschiedenen Sigmafaktoren wieder, da diese unterschiedlichen Spektren an Zielgenen aktivieren und um die RNAP konkurrieren (Grigorova et al., 2006; Ishihama, 2000). In exponentiell-wachsenden *E. coli*-Zellen ist RpoD der dominanteste Sigma-Faktor. Er sorgt für die Expression der Gene, die für exponentielles Wachstum und den entsprechenden Metabolismus notwendig sind. Mit abnehmenden Nährstoff-Ressourcen und dem Übergang zur stationären Phase bindet verstärkt RpoS, dessen Expression sich in dieser Phase drastisch erhöht, an die limitierten Mengen RNAP. Als Resultat wird die Transkription hunderter Gene gestartet, deren Produkte für eine multiple Stressresistenz, einen angepassten Metabolismus und weitere Funktionen in der stationären Phase verantwortlich sind (Weber et al., 2005). Hinzu kommen Aktivitäten weiterer, alternativer Sigma-Faktoren (Kapitel 1.2.1), die die Wechselwirkungen zwischen RpoS und RpoD ergänzen oder teilweise komplett ersetzen.

Die Verlagerung der Genexpression über RpoS zu Beginn der stationären Phase löst eine regulatorische Maschinerie aus, die in der Synthese von amyloiden Curli-Fasern und pEtN-Cellulose als Komponenten der Biofilmmatrix gipfelt. Auf Grund der Komplexität dieses Netzwerkes wird im Folgenden nicht auf jedes Detail, dargestellt in Abb. 4, eingegangen. Der Review Artikel von R. Hengge (2020) lieferte eine umfassende Übersicht der Prozesse (Hengge, 2020).

Das Rückgrat des oben beschriebenen Netzwerkes bilden Transkriptionsfaktoren (TF). Einige sind in Kaskaden angeordnet und fungieren als Hauptknotenpunkte, die auf verschiedenen Hierarchieebenen wirken. In *E. coli* ist ein solcher Knotenpunkt CRP. CRP organisiert Wachstum und Stoffwechsel in Gegenwart begrenzter Ressourcen (Busby & Ebright, 1999; You et al., 2013). Eine entgegengesetzte Rolle wird von RpoS ausgeübt, in dem es das Überleben in hungernden und/oder stark gestressten Zellen koordiniert (Hengge, 2011b). Auf einer tiefer liegenden und mehr spezifischeren Ebene liegen die wichtigsten Transkriptionsknotenpunkte FlhDC und CsgD. Durch ihre invers geschaltete Funktionsweise kontrollieren sie den Übergang von einzelnen flagellierten Zellen bis hin zu adhäsiver Vielzelligkeit (Grainger et al., 2005; Pesavento et al., 2008). Diese TFs steuern eine Vielzahl von Genen (Fitzgerald et al., 2014; Girgis et al., 2007; Grainger et al., 2005; Mika et al., 2012;

Ogasawara et al., 2011; Weber et al., 2005) und integrieren zahlreiche Umwelt- und Zellsignale in ihre eigene Expression und Aktivität. Für RpoS, FlhDC und CsgD wird dies durch sehr komplexe Regulationsmechanismen erreicht, die Transkription, Transkriptstabilität, Translation, Proteolyse und Aktivität umfassen. Neben einer komplexen Transkriptionskontrolle wird der Signaleingang auch auf mRNA-Ebene durch zahlreiche kleine regulatorische RNAs (sRNA) zusätzlich beeinflusst, so dass die Expression von RpoS, FlhDC und CsgD reguliert und miteinander verbunden wird (De Lay & Gottesman, 2012; Mika & Hengge, 2014). Zudem wird durch eine regulierte Proteolyse von RpoS und FlhDC eine schnelle Reversibilität der verschiedenen Zustände im Netzwerk ermöglicht (Hengge, 2011a; Takaya et al., 2012).

Das dynamische Umschalten des Netzwerks erfordert ebenfalls den Input von kleinen Nukleotiden, die entweder direkt die Nährstoffverfügbarkeit (GTP) widerspiegeln oder als sekundärer Botenstoff ([p]ppGpp, cAMP oder c-di-GMP) wirken. Diese werden als Reaktion auf bestimmte Umwelt- oder zelluläre Reize enzymatisch synthetisiert oder abgebaut.

In *E. coli* aktiviert RpoS die Expression von CsgD (Abb. 4). Dieser TF ist essentiell für die Produktion von amyloiden Curli Fasern und pEtN-Cellulose, und damit für die Bildung vielzelliger Aggregate. Ein wichtiger Bestandteil in diesem Regulationskreis ist der sekundäre Botenstoff c-di-GMP. Er spielt eine Schlüsselrolle bei der inversen Koordination zwischen cAMP-CRP/FlhDC/ σ^{FliA} -getriebenem Wachstum inkl. Flagellenaktivität und RpoS/CsgD-abhängiger Vielzelligkeit (Lindenberg et al., 2013; Pesavento et al., 2008). Während fast alle c-di-GMP-kontrollierenden Enzyme parallel exprimiert werden, steuern spezifische DGCs oder PDEs unterschiedliche Ziele wie Flagellenrotation, csgD-Transkription oder die Aktivität der Cellulosesynthase an. Dies geschieht ohne Beeinflussung des zellulären c-di-GMP-Spiegels, der insgesamt überraschend niedrig bleibt (max. 200 nM) (Sarenko et al., 2017). Somit scheinen zumindest einige c-di-GMP-kontrollierende Enzyme lokal zu wirken. Dieses Konzept wird durch direkte Wechselwirkungen einiger Enzyme mit spezifischen Effektor/Ziel-Systemen unterstützt, von denen beobachtet wurde, dass sie beispielsweise bei der Kontrolle der csgD-Transkription in *E. coli* eine Rolle spielen (Hengge, 2016; Lindenberg et al., 2013; Sarenko et al., 2017).

Neben Induktion der Synthese und Zusammenbau von Flagellenkomponenten steuert die FlhDC/ σ^{FliA} -Kaskade auch die Expression von mindestens drei Faktoren, die bei dieser c-di-GMP Signalübertragung eine wichtige Rolle spielen: (1) PdeH, (2) das GTPase-Signalisierungssystem RdcA/RdcB und (3) das c-di-GMP-bindende Effektorprotein, YcgR. PdeH („Master PDE“) ist die am häufigsten vorkommende PDE in *E. coli* und behält konstant einen sehr niedrigen zellulären c-di-GMP-Spiegel bei (Sarenko et al., 2017). Während des Eintritts in die stationäre Phase fungiert das RdcA/RdcB-System als Sensor für den abnehmenden GTP-Spiegel und aktiviert die c-di-GMP-Synthese durch DgcE. DgcE liegt auf der höchsten regulatorischen Ebene im Netzwerk und gehört ebenfalls zu den von RpoS eingesetzten regulatorischen Komponenten (Pfiffer et al., 2019). Durch die Bindung von c-di-

GMP interagiert YcgR mit dem Flagellenbasalkörper und hemmt die Flagellenrotation. Diese Hemmung verringert die Motilität in planktonischen Zellen, die sich der stationären Phase nähern (Boehm et al., 2010; Fang & Gomelsky, 2010; Paul et al., 2010) und kann die Flagellen vor einer Überdehnung durch sich ineinander verwickelnde Flagellen in der unteren Schicht dicht gepackter Makrokolonie-Biofilme schützen (Serra et al., 2013b).

DgcE-produziertes c-di-GMP liefert auch die wesentliche positive Stimulation der Expression des Matrixregulators CsgD durch Kontrolle der Aktivität von MlrA (Lindenberg et al., 2013; Pesavento et al., 2008; Pfiffer et al., 2019). Dieser TF ist essentiell, um die Transkription am *csgD*-Promotor spezifisch zu aktivieren (Brown et al., 2001; Ogasawara et al., 2010). MlrA bindet c-di-GMP jedoch nicht direkt, sondern wird von einem dazwischenliegenden sensorischen Modul für c-di-GMP gesteuert, das aus PdeR („Trigger PDE“) und DgcM besteht. PdeR dient als direkt wechselwirkender Inhibitor von MlrA und DgcM, zumindest so lange es nicht damit beschäftigt ist, DgcE-produziertes c-di-GMP zu binden und abzubauen. Ist dies der Fall, kommt es zu einer Freisetzung von DgcM und MlrA. In einem Komplex vermitteln diese beiden Proteine dann die Transkriptionsaktivierung von *csgD*. Darüber hinaus generiert DgcM auch c-di-GMP, das für eine positive Rückkopplung sorgt, indem PdeR als PDE „beschäftigt“ bleibt (Hengge et al., 2016; Lindenberg et al., 2013). Die resultierende *csgD*-mRNA wird von zahlreichen sRNAs angegriffen, die die Stabilität des *csgD*-Transkripts und/oder die Translationsinitiierung modulieren können.

Auf der untersten Ebene der regulatorischen Hierarchie hat c-di-GMP einen Einfluss auf die Produktion der extrazellulären Matrixproduktion. Hier aktiviert DgcC hochspezifisch den gleichermaßen membranlokalisierten Cellulosesynthasekomplex, in dem die beiden c-di-GMP-Bindungskomponenten BcsA und BcsE die Cellulosesynthese bzw. die pEtN-Modifikation steuern (Brombacher et al., 2003; Fang et al., 2014; Morgan et al., 2014; Thongsomboon et al., 2018; Zogaj et al., 2001). Hier können mehrere PDEs als Antagonisten wirken, darunter die fünf Transmembran-PDEs mit periplasmatischen redoxkontrollierten CSS-Domänen (Herbst et al., 2018). Diese pEtN-Cellulose-spezifische c-di-GMP-Kontrolle ermöglicht es den Zellen, das Verhältnis von pEtN-Cellulose zu tatsächlich produzierten Curli-Fasern zu ändern, wodurch die Anpassung der biomechanischen Eigenschaften der Matrix in den verschiedenen Zonen der Makrokolonie-Biofilme ermöglicht wird (Klauck et al., 2018). Durch die Assoziation mit Flagellen können pEtN-Cellulosefibrillen auch die Flagellenrotation direkt stören (Zorraquino et al., 2013). Insgesamt werden Flagellenexpression/-aktivität und matrixabhängige Vielzelligkeit somit durch eine robuste Kombination von Mechanismen auf allen Ebenen der Kontrollhierarchie umgekehrt koordiniert.

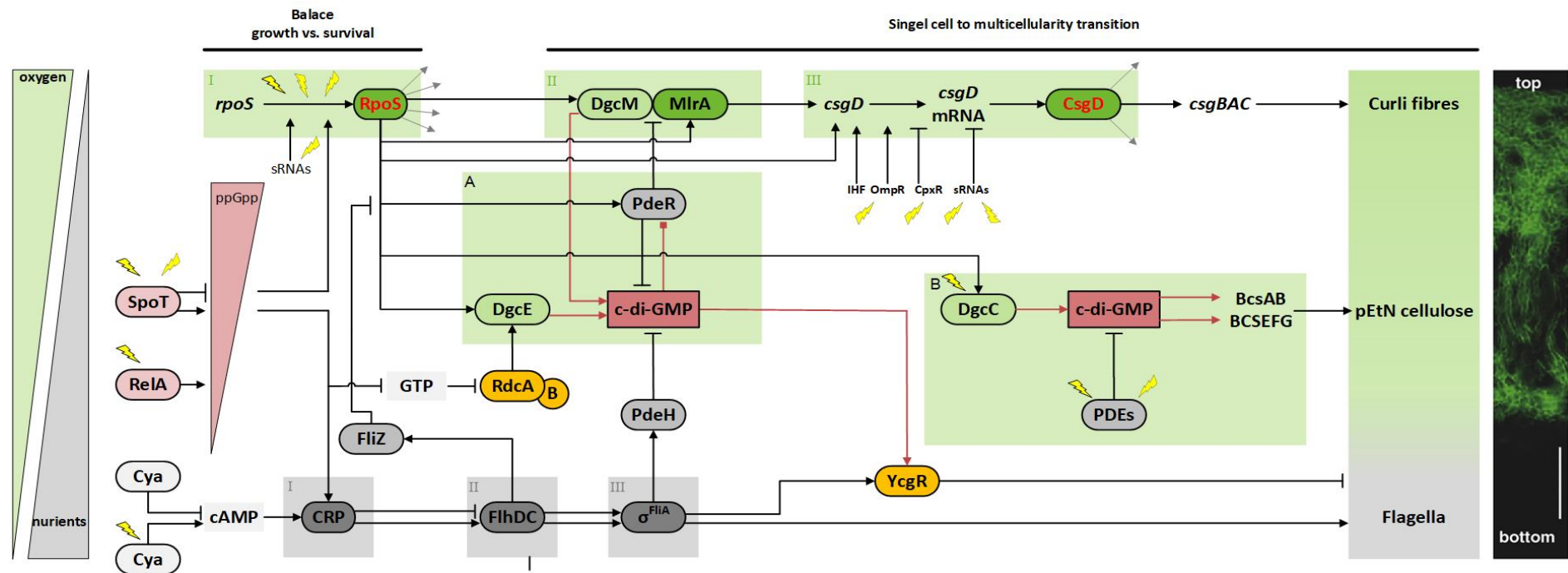


Abb. 4: Kontrolle der physiologischen Differenzierung der Makrokolonie-Biofilmbildung in *E. coli*

Während cAMP/CRP erforderlich ist, um Flagellengene zu exprimieren (Soutourina et al., 1999), tragen (p)ppGpp und c-di-GMP zur umgekehrten Koordination der Kaskaden des Flagellen- und des Biofilmmatrix-Transkriptionsfaktors bei (angezeigt durch hellgraue- und hellgrüne Kästchen I bis III). Steigende zelluläre (p)ppGpp-Spiegel regulieren die Expression von FlhDC herunter (Lemke et al., 2009), aktivieren die *rpoS*-Transkription (Gentry et al., 1993; Lange et al., 1995) und fördern die Bindung von RpoS an das RNAP-Kernenzym (Jishage et al., 2002). C-di-GMP beeinflusst die Flagellenfunktion und die Biofilmmatrix-Produktion über zwei unterschiedliche regulatorische Module. Im Signalmodul A hemmt c-di-GMP, durch PdeH und DgcE antagonistisch gesteuert, die Flagellenrotation über YcgR (Boehm et al., 2010; Fang & Gomelsky, 2010; Paul et al., 2010). Zusätzliche beeinflusst c-di-GMP die Wechselwirkungen von PdeR, DgcM und MlrA, um die Expression von CsgD zu aktivieren. Diese ist für die Produktion von Curli-Fasern und pEtN-Cellulose erforderlich (Hengge et al., 2016; Lindenberg et al., 2013; Pesavento et al., 2008). Im Gegensatz dazu steuert das Signalmodul B die pEtN-Cellulosebiosynthese. Hier erzeugt csgD-gesteuertes DgcC, dass direkt mit dem Cellulosesynthasekomplex (BcsAB-BcsEFG) interagiert, das lokale c-di-GMP. Dies wiederum aktiviert die Cellulosesynthese durch BcsA über den Transmembran-BcsEF-Weg. Die pEtN-Modifikation der Cellulose wird von BcsG übernommen. Eine orangene Färbung kennzeichnet Komponenten, die von der Flagellenkontrollkaskade eingesetzt werden, aber der Flagellenaktivität entgegenwirken und die Vielzelligkeit fördern. Transkriptions-Schnittstellen werden durch rote Schrift hervorgehoben. Rechts wird ein vertikaler Kryoschnitt durch einen Makrokolonie-Biofilm von *E. coli* dargestellt. pEtN-Cellulose und Amyloid-Curli-Fasern wurden mit Thioflavin-S gefärbt (Klauck et al., 2018; Serra & Hengge, 2019). Auf der linken Seite ist die Richtung der Nährstoff- und Sauerstoffgradienten im Biofilm angegeben. Der Inhalt dieser Abbildung basiert auf den folgenden Review Artikeln: (Hengge et al., 2019; Hengge, 2020).

1.7 CSS-Phosphodiesterasen

Eine weitere interessante, aber zurzeit recht unbekannte Rolle in der c-di-GMP-vermittelten Signaltransduktion und der damit verbundenen Biofilmmatrixproduktion spielen die CSS-Domänen-PDEs. Die CSS-Domänen-PDEs in *E. coli* K12 bilden eine Gruppe aus fünf verschiedenen PDEs (PdeB, PdeC, PdeD, PdeG und PdeN), die sich in ihrer Domänenarchitektur sehr stark gleichen. Sie bestehen aus zwei Transmembran-Domänen, die über einen periplasmatischen Bogen von ca. 200 Aminosäuren miteinander verbunden sind. In diesem periplasmatischen Bogen finden sich zwei hoch konservierte Cysteine, die zusammen die CSS-Sensordomäne bilden. Eines der konservierten Cysteine befindet sich in einem CSS (Cys-Ser-Ser)-Motiv und ist Namensgeber dieser PDE-Familie. Die katalytische EAL-Domäne, eine konservierte Protein-Domäne in diversen bakteriellen Signalproteinen, benannt nach ihren konservierten Aminosäureresten, befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins. Hinzu kommt, dass in einigen pathogenen *E. coli* Stämmen (EHEC und EPEC) zusätzlich zu den fünf *E. coli* K12 CSS-Domänen-PDEs eine weitere, PdeT (ehemals VmpA), nachgewiesen werden konnte (Branchu et al., 2013; Hengge et al., 2015; Povolotsky & Hengge, 2016). Auf Grund der geringen Verbreitung innerhalb von *E. coli* wird diese hier aber nicht weiter berücksichtigt.

1.7.1 PdeC als Model für die transmembrane Redox-Kontrolle

Die beschriebene Struktur der CSS-Domänen-PDEs legt nahe, dass sich eine DSB in der periplasmatischen CSS-Domäne zwischen den beiden konservierten Cystein-Resten ausbildet. Diese beeinflusst die enzymatische Aktivität der C-terminalen, sich im Cytoplasma liegenden EAL-Domäne. Die für den periplasmatischen Raum beschriebene oxidierende Umgebung mit ihrer komplexen Redox-Homöostase (Kapitel 1.4) könnte die Ausbildung von DSBs und eine Nutzung als Redox-abhängige Schalter nahelegen (Wouters et al., 2010).

Um den Mechanismus der transmembranen Redox-Kontrolle der CSS-Domänen-PDEs aufzuklären, wurde exemplarisch PdeC detailliert analysiert (Herbst et al., 2018). Herbst et al. (2018) zeigten, dass die Presenz der beiden periplasmatischen Cysteine, Cys75 und Cys106, zu einer geringeren PDE-Aktivität führt, die Mutation eines oder beider Cysteine hingegen eine erhöhte PDE-Aktivität zur Folge hatte. Hinzu kommt, dass DsbA und DsbB an der Ausbildung der periplasmatischen DSB in der CSS-Domäne von PdeC verantwortlich sind. Das Fehlen dieser DSB verringert maßgeblich die Proteinstabilität und führt, nach proteolytischer Spaltung, zu einem kleineren Membran-assoziierten Polypeptid, das aus der Transmembrandomäne 2 (TM2) und der EAL-Domäne besteht. Dies bestätigt sich auch unter Verwendung des Reduktionmittels Dithiothreitol (DTT). Nach Zugabe wurde der gleiche proteolytische Abbau beobachtet und bestätigte die Redox-regulierte Funktion von PdeC. Verantwortlich für die Proteolyse sind die periplasmatischen Proteasen DegP und DegQ.

Außerdem wird die periplasmatische DSB in der CSS-Domäne nicht für die Aktivität von PdeC benötigt, da das kleinere Polypeptid (TM2-EAL) ebenfalls PDE-Aktivität besitzt (Abb. 5).

Die TM2-Domäne von PdeC wirkt als Dimerisierungs-Domäne, wobei die DSB-Bildung in der CSS-Domäne im Periplasma ebendieser Dimerisierung entgegenwirkt. Sind die periplasmatischen Cysteine von PdeC in der freien Thiol Konformation, kann die Dimerisierung erfolgen und eine erhöhte PDE-Aktivität der EAL-Domäne mit sich führen.

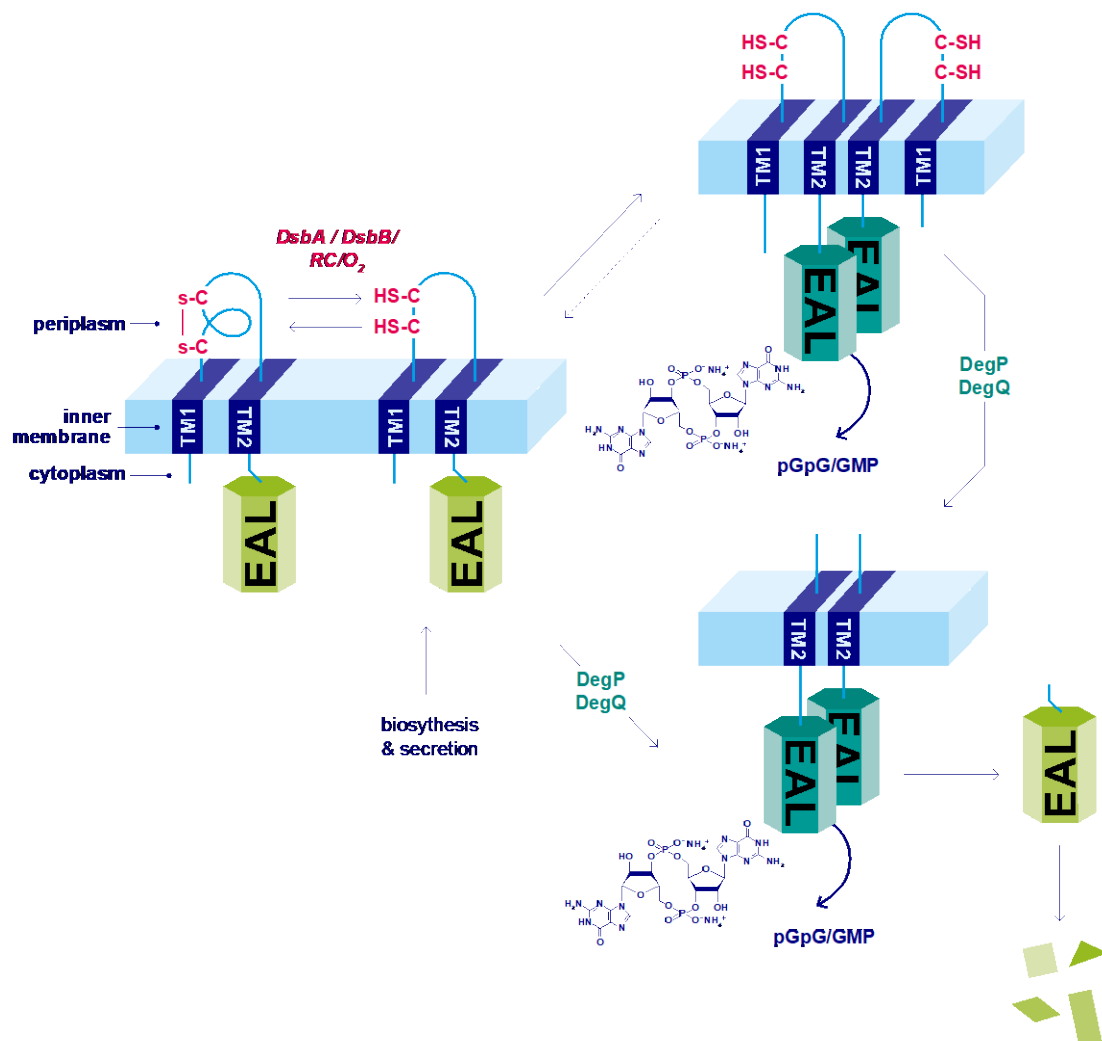


Abb. 5: Modell der Funktionsweise von PdeC aus *Escherichia coli* steuert

Neu synthetisiertes und in die Membran inseriertes PdeC hat mehrere Optionen: (1) DSB-Bildung (unterstützt durch DsbA / DsbB, wobei Elektronen über die Atmungskette (RC) an Sauerstoff geliefert werden), (2) Dimerisierung und / oder (3) DegP / DegQ-vermittelte Prozessierung zu der kürzeren, noch in der Membran verankerten TM2 + EAL-Form, die ebenfalls dimerisiert. Dimere von vollständigem oder verarbeitetem PdeC zeigen eine erhöhte PDE-Aktivität (symbolisiert durch dunkelblaue EAL-Domänen), wodurch c-di-GMP verringert wird. Dadurch wird wiederum die Produktion von Biofilmmatrixkomponenten inhibiert. Unter standardisierten, aeroben Wachstumsbedingungen wird eher die DSB-Bildung als die Dimerisierung des 'Full-size' Proteins begünstigt. Dies hat zu Folge, dass PdeC in einer weniger aktiven oder inaktiven Form existiert. Proteasen, die an der Prozessierung des durch DegP / DegQ-erzeugten TM2 + EAL-Fragments von PdeC beteiligt sind, müssen noch identifiziert werden (Herbst et al., 2018).

Um die Rolle von PdeC innerhalb der komplexen Regulationsvorgänge der Biofilmbildung zu beobachten, wurden vertikale Kryoschnitte von Makrokolonien ausgewertet, nachdem zuvor die Biofilm-Matrix mit dem Farbstoff Thioflavin S angefärbt wurde. PdeC ist unter Standard-Laborbedingungen in Makrokolonieexperimenten keinesfalls inaktiv, sondern gibt in tieferen Schichten durch gezielte Reduktion der Matrixproduktion, der Biofilmmatrixarchitektur ihre Form (Herbst et al., 2018).

Durch das Zusammenspiel von Redox-abhängiger Aktivitätskontrolle und Proteolyse der c-di-GMP-spezifischen PdeC wird die Produktion der amyloiden Curli-Fasern und Cellulose reguliert, welche Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Biofilmen sind. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll der Frage nachzugehen, warum *E. coli* K12 fünf verschiedene CSS-Domänen-PDEs besitzt und worin sich ebendiese in ihrer Funktion und Aktivität unterscheiden.

2 ZIELSETZUNG

Der Sekundärbotenstoff c-di-GMP fördert nahezu ubiquitär die Bildung von bakteriellen Biofilmen, wobei Enzyme, die c-di-GMP synthetisieren und abbauen, von verschiedenen N-terminalen Sensordomänen gesteuert werden (Hengge, 2009; Povolotsky & Hengge, 2016). Im Jahr 2018 wurde von Herbst et al. eine neuartige Klasse von weit verbreiteten c-di-GMP-PDEs beschrieben, die eine periplasmatische "CSS-Domäne" aufweisen und von zwei Transmembranregionen (TM1 und TM2) flankiert wird. An der TM2 hängt eine cytoplasmatische EAL-Domäne mit Phosphodiesterase-Aktivität (Herbst et al., 2018).

Genetische Daten weisen darauf hin, dass die freie Thiol-Form von PdeC die aktive Form darstellt. Um dies auch biochemisch zu zeigen, sollte experimentell gereinigtes PdeC in Nanodiscs rekonstituiert und auf seine PDE-Aktivität getestet werden.

Die Familie der CSS-Domänen-PDEs umfasst in *E. coli* K12 fünf Mitglieder (PdeB, PdeC, PdeD, PdeG und PdeN), die sich in ihrem strukturellen Aufbau gleichen. Von Interesse war es Unterschiede ebendieser fünf Varianten herauszuarbeiten und deren potentiell unterschiedlichen Wirkungsweisen und Funktionalitäten aufzuzeigen. Der Fokus dieser Arbeit sollte daher auf einem Vergleich der Redox-Biochemie, Proteolyse und Stabilität der fünf CSS-Domänen-PDEs von *E. coli* liegen.

In Vorversuchen mit PdeN wurde eine deutlich erhöhte PDE-Aktivität bei sauren Wachstumsbedingungen, verglichen mit den anderen 4 CSS-Domänen PDEs, beobachtet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der dahinter liegende Mechanismus aufgeklärt und die Unterschiede in dem Regulationsmechanismus vergleichend zu PdeB, PdeC, PdeD und PdeG aufgezeigt werden.

Die präzise regulierte Produktion von amyloiden Curli Fasern und Cellulose ist entscheidend für das Überleben von *E. coli* unter nicht optimalen Wachstumsbedingungen. Die Analyse der CSS-Domänen-PDE soll das Verständnis der komplexen Regulation der Biofilmmatrixproduktion erweitern.

Das vielseitige Zusammenspiel von Expression, Redox-Kontrolle und Proteolyse für die CSS-Domänen-PDEs kann unter den genannten Voraussetzungen für die Ausbildung von Biofilmen von großem Interesse sein.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Chemikalien und Materialien

Die in dieser Arbeit standartmäßig verwendeten Chemikalien und Materialien wurden von den Herstellern AppliChem, Millipore, Merck, Carl Roth, New England Biolabs, Roche, Sigma-Aldrich und VWR bezogen. Weitere Geräte und Produkte mit Bezugsquellen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 1: Bezugsquellen der Chemikalien und Materialien

Produkt	Hersteller (Spezifikation)
[α -32P]-c-di-GMP	Hartmann Analytic GmbH
Acrylamid-Bisacrylamid	Carl Roth
Agarose	Biozym Scientific
Anti-6-His Antikörper	Biomol, Bethyl Laboratories
Anti-Rabbit IgG Horeseradish Peroxidase	GE Healthcare
Antibiotika (Amp, Cm, Kan, Tet)	Carl Roth, Sigma, Merck
APS	Carl Roth
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company
Bacto-Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company
BCIP	Carl Roth
Bio-Beads TM SM-2	Bio-Rad
Bromphenol Blau	Carl Roth
Bromphenolblau	Carl Roth
c-di-GMP	BIOLOG Life Science Institute
CaCl	Carl Roth
Casamino-Acids	Becton, Dickinson and Company
Cellulosefilter mit einer Porengröße von 0,22 μ m	Carl Roth
Chloroform	Carl Roth
CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase)	New England Biolabs
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	AppliChem GmbH
CutSmart [®] Puffer	New England Biolabs
DDM	Carl Roth
DNA-Polymerasen (Opti-Taq, Q5)	Roboklon, New England Biolabs
dNTP-Stammlösungen	MP Biomedicals
DTT	Carl Roth
Dünnschichtchromatographieplatten	POLYGRAM CEL 300 PEI, Macherey-Nagel
E. coli Total Lipid Extrakt (25 mg gelöst in 1 ml Chloroform)	Avanti
ECL-Reagenz (Clarity Western ECL Substrate)	Bio-Rad
EDTA	AppliChem GmbH
GelRed	Genaxxon, 0,001 % in H ₂ O
Glukose	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Imidazol	Carl Roth
IPTG	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth

Produkt	Hersteller (Spezifikation)
KCl	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	Carl Roth
Kongorot	Merck
Ligase-Puffer	(Hersteller)
Lysozym	Carl Roth
MgCl	Carl Roth
Milchpulver	Carl Roth
Na ₂ CO ₃	Carl Roth
Na ₂ HOP ₄	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
NaH ₂ PO ₄	Carl Roth
NaOH	Carl Roth
Natrim-Citrat	Carl Roth
NBT	AppliChem GmbH
Oligonukleotide	Metabion
ONPG	Carl Roth
PD-10-Säulen	GE Healthcare
Polyacrylamidlsg. 30%,	Carl Roth
Ppolyethylenglykol-6000	Carl Roth
Proteaseinhibitor	Roche (cOmplete)
Protino Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
PVDF Blotmembran für Proteine	Carl Roth (Roti-PVDF)
PVDF-Membran	®Roti-PVDF, Carl Roth
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
SDS	AppliChem GmbH
SDS-PAGE Kammern	C.B.S. Scientific
Span-Agar	Zell + Mohr GmbH
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
TCA	Carl Roth
TEMED	Carl Roth
Tris	Carl Roth
Tween-20	Carl Roth
Whatman Gel-Blotting-Papier	Carl Roth
X-Gal	Carl Roth
Xylencyanol	Carl Roth

Tab. 2: Bezugsquellen der Geräte

Produkt	Hersteller (Spezifikation)
Äkta	GE Healthcare
Blottingapparaturen	Bio-Rad, Peqlab
CCD-Kamera	GE Healthcare (ImageQuant LAS4000), INTAS (Chemocam Imager)
CCD-Kamera (Einstellungen, Hersteller)	
Elektroporator	Bio-Rad (Gene Pulser Xcell)
ELISA Reader	Bio-Rad (Model 550)
French Press	G. Heinemann (HTU – DIGI-F-Press)
Geldokumentationsanlage	Biozym
Luftschüttler	New Brunswick Scientific
PAGE-Apparatur	Bio-Rad
PCR-Thermocycler	Thermo Scientific (Arktik)
Photometer	GE Healthcare (GeneQuant 100)
Typhoon Reader FLA7000	GE Healthcare
Wasserbad	HT Infors AG

Tab. 3: Zentrifugen

Produkt	Hersteller (Spezifikation)
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific
Sorvall Lynx 4000	Thermo Scientific
Sorvall WX Ultra Series	Thermo Scientific

Tab. 3: Rotoren

Produkt	Hersteller (Spezifikation)
T-865	Thermo Scientific
T-647.5	Thermo Scientific
F10-4x1000 LEX (Sorvall Lynx 4000)	Thermo Scientific
F12-6x500 (Sorvall Lynx 4000)	Thermo Scientific
F21-8x50y (Sorvall Lynx 4000)	Thermo Scientific

3.2 Puffer

3.2.1 Allgemeine Puffer und Färbelösungen

6x DNA Puffer:

Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
Glycerin	30 % gelöst in TAE

50x TAE Puffer:	Tris	424 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA pH 8	100 ml

Die Lösung wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ auf 1 l aufgefüllt. Für die Verwendung für die Agarose-Gelelektrophorese wurde die Stocklösung auf eine einfache Konzentration verdünnt.

4x SDS Probenpuffer:	Tris-HCl pH 6,8	240 mM
	SDS-Lsg.	8 %
	Glycerin	40 %
	DTT	400 mM
	Bromphenolblau	0,02 %

SDS-PAGE Elektrophoresepuffer:	Tris-HCl pH 8	25 mM
	Glycerin	190 mM
	SDS-Lsg.	0,1 %

Trenngelpuffer:	Tris-HCl pH 8,8	25 mM
	SDS-Lsg.	0,4 %

Sammelgelpuffer:	Tris-HCl pH 6,8	25 mM
	SDS-Lsg.	0,8 %

Coomassie-Färbelsg.:	Isopropanol	25 %
	Essigsäure	10 %
	Coomassie-Brilliant Blue G	0,05 %

10x PBS:	Na_2HOP_4	7,64 g
	KH_2PO_4	2 g
	Mit NaOH auf pH 7,3 einstellen	
	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Auf 1 l auffüllen und autoklavieren	

Transblotpuffer:	Tris-HCl pH 7,5	25 mM
	Glycerin	192 mM
	EtOH	20 %

TBST:	Tris-HCl pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween-20	0,05 %

TBSTM:	5 % Magermilchpulver in TBST	
---------------	------------------------------	--

5x Z-Puffer:	Na_2HPO_4	60 mM
	NaH_2PO_4	40 mM
	KCl	1 mM
	Mg_2SO_4	1 mM

3.2.2 Puffer zur Reinigung von löslichen Proteinen

Lysis Puffer:	Tris-HCl pH 8	50 mM
	NaCl	300 mM
	MgCl_2	5 mM
	Imidazol	10 mM

Kurz vor Verwendung zugeben:	2 Tabletten	cOmplete	Proteaseinhibitor (Roche)
------------------------------	-------------	----------	---------------------------

Waschpuffer:	Tris-HCl pH 8	50 mM
	NaCl	400 mM
	Glycerin	10 %
	MgCl ₂	10 mM
	Imidazol	20 mM
Kurz vor Verwendung zugeben:	DTT	5 mM
	1 Tablette cOmplete Proteaseinhibitor (Roche)	

Elutionspuffer:	Tris-HCl pH 8	50 mM
	NaCl	400 mM
	Glycerin	10 %
	MgCl ₂	10 mM
	Imidazol	250 mM

3.2.3 Puffer zur Reinigung von Membranproteinen

Pufferstock:	Tris pH 7,5	50 mM
	NaCl	300 mM
	MgCl ₂	10 mM

Resuspensionspuffer: Pufferstock mit einer Tablette cOmplete Proteaseinhibitor (Roche) auf 100 ml

Solubilisierungspuffer:	Pufferstock mit	
	Glycerin	5 %
	Imidazol	10 mM

Kurz vor Verwendung zugeben:

Eine Tablette cOmplete Proteaseinhibitor (Roche) auf 20 ml	
DDM	2 %

Waschpuffer 1:	Pufferstock mit	
	Glycerin	5 %
	Imidazol	10 mM
Kurz vor Verwendung zugeben:	Eine Tablette cOmplete Proteaseinhibitor (Roche) auf 200 ml	
	DDM	0,5 %
Waschpuffer 2:	Pufferstock mit	
	Glycerin	5 %
	Imidazol	20 mM
Kurz vor Verwendung zugeben:	Eine Tablette cOmplete Proteaseinhibitor (Roche) auf 200 ml	
	DDM	0,05 %
Elutionspuffer:	Pufferstock mit	
	Imidazol	250 mM
Kurz vor Verwendung zugeben:	DDM	0,05 %
CRB-Puffer:	Tris-HCl pH 8	25 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	10 mM
	Glycerin	5 %

3.3 Rezepte für Flüssigmedien und Agarplatten

3.3.1 Flüssigmedien

<i>Lysogeny Broth (LB) – Medium</i>	Bacto Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren

SOB-Medium

Bacto Trypton	20 g
Bacto-Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	0,19 g
H ₂ O	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren

SOC-Medium

SOB-Medium unter Zusatz von	MgCl ₂	10 mM
	Glukose	20 mM

MgCl₂: Sterilisation durch Autoklavieren, Glukoselösung: Sterilfiltration

TB-Medium

Bacto Trypton	12 g
Bacto-Hefeextrakt	24 g
H ₂ O	900 l

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 100 ml Kalium-Phosphat-Puffer (Stammkonzentration: 0,17 M KH₂PO₄ & 0,72 M K₂HOP₄, separat sterilisiert durch Autoklavieren) und 5 ml Glycerin (Stammkonzentration 80 %, separat sterilisiert durch Filtration)

2x TSS-Medium

LB-Medium unter Zusatz von	PEG-6000	20%
	MgSO ₄	100 mM
	DMSO	10 %

Sterilisation durch Autoklavieren

3.3.2 Festmedien

LB / LBnoS-Agar	Bacto Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Span-Agar	18 g
	H ₂ O	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren. LBnoS-Agar wurde ohne Zugabe von NaCl hergestellt

YESCA-Agar	Casamino Acids	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	1 g
	Span-Agar	18 g
	H ₂ O	1 l

Sterilisation durch Autoklavieren.

X-Gal-Agarplatten

Autoklavierter LB-Agar unter Zugabe von 40 mg/l 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal, gelöst in N,N-Dimethylformamid und sterilfiltriert)

Natriumcitrat-Agarplatten

Autoklavierter LB-Agar unter Zugabe von 20 mM Natriumcitrat

Kongorot-Platten (CR)

LB/LBnoS-Agar unter Zugabe von 20 ml Kongorot-Lösung pro 1 l

Kongorot-Lösung in 70 % Ethanol	Kongorot	2 mg/ml
	Coomassie-Brilliant Blue G	1 mg/ml

Kongorotlösung wurde sterilfiltriert dem autoklavierten Agar zugegeben

3.4 Verwendete Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

Während der praktischen Durchführung dieser Arbeit wurde die Nomenklatur aller 29 *E. coli* K-12 Gene, die für Proteine mit GGDEF und/oder EAL-Domänen codieren standardisiert (Hengge et al., 2015). Alle in dieser Arbeit hergestellten Bakterienstämme, Plasmide oder Primer richten sich nach der neuen Nomenklatur. Materialien, die vor der Namensänderung hergestellt wurden tragen aus Gründen der Reproduzierbarkeit noch die alten Bezeichnungen. Eine Übersicht der neuen und alten Stammnamen wird in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Neue Bezeichnungen der Gene, die für GGDEF/EAL codieren nach Hengge et al. 2015

Gene, die für Diguanylatzyklasen codieren (DGCs)		Gene, die für Phosphodiesterasen codieren (PDEs)	
Neuer Name	Alter Name	Neuer Name	Alter Name
<i>dgcC</i>	<i>yaiC</i>	<i>pdeN</i>	<i>rtn</i>
<i>degcT</i>	<i>ycdT</i>	<i>pdeL</i>	<i>yahA</i>
<i>dgcM</i>	<i>ydaM</i>	<i>pdeG</i>	<i>ycgG</i>
<i>dgcO</i>	<i>yddV</i>	<i>pdeR</i>	<i>yciR</i>
<i>dgcZ</i>	<i>ydeH</i>	<i>pdeO</i>	<i>yddU</i>
<i>dgcJ</i>	<i>yeaJ</i>	<i>pdeA</i>	<i>yfeA</i>
<i>dgcP</i>	<i>yeaP</i>	<i>pdeF</i>	<i>yfgF</i>
<i>dgcO</i>	<i>yedQ</i>	<i>pdeH</i>	<i>yhjH</i>
<i>dgcE</i>	<i>yegE</i>	<i>pdeK</i>	<i>yhjK</i>
<i>dgcN</i>	<i>yfiN</i>	<i>pdeC</i>	<i>yjcC</i>
<i>dgcl</i>	<i>yliF</i>	<i>pdeB</i>	<i>ylaB</i>
<i>dgcF</i>	<i>yneF</i>	<i>pdeI</i>	<i>yliE</i>
<i>dgcX</i>	EC55989-0813	<i>pdeD</i>	<i>yoaD</i>
<i>dgcY</i>	EcSMS35-1716	<i>pdeT</i>	Z1528
Gene, die für Proteine mit degenerierten GGDEF und EAL Domänen codieren		<i>pdeW</i> <i>pdeX</i>	EcE24377A-E0053 ECP-2965
Neuer Name	Alter Name	<i>pdeY</i>	UTI89-C1116
<i>bluF</i>	<i>ycgF</i>		
<i>cdgl</i>	<i>yeal</i>		
<i>rflP</i>	<i>ydiV</i>		
<i>csrD</i>	<i>yhda</i>		

Tab. 5: Verwendete Bakterienstämme

Stammname	Genotyp / Beschreibung	Referenz
AP217	W3110 <i>yddV::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR032	W3110 <i>rpoS::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR038	W3110 <i>yciR::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR054	W3110 <i>ydeH::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR056	W3110 <i>yeaJ::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR058	W3110 <i>yeaP::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR060	W3110 <i>yliF::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR070	W3110 <i>yneF::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR080	W3110 <i>yddU::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR082	W3110 <i>yfeA::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR084	W3110 <i>yfgF::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR086	W3110 <i>yhjK::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR088	W3110 <i>rtn::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR090	W3110 <i>ycgF::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR092	W3110 <i>yjcC::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR094	W3110 <i>yliE::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
AR190	AR3110 <i>yhjH::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR191	AR3110 <i>ydaM::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR192	AR3110 <i>yciR::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR193	AR3110 <i>yaiC::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR194	AR3110 <i>yoaD::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)

Stammname	Genotyp / Beschreibung	Referenz
AR196	W3110 <i>yoaD</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR199	AR3110 <i>yegE</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR200	AR3110 <i>yhjK</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR201	W3110 <i>yaiC</i> ::scar	(Richter & Hengge, 2016)
AR220	AR3110 <i>rtn</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR221	AR3110 <i>yfiN</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR222	AR3110 <i>ylaB</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR223	AR3110 <i>ycgG</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR224	AR3110 <i>ydiV</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR225	AR3110 <i>yeaI</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR226	AR3110 <i>yahA</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR227	AR3110 <i>ycdT</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR231	AR3110 <i>yliE</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR232	AR3110 <i>yliF</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR233	AR3110 <i>yneF</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR234	AR3110 <i>yeaP</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR235	AR3110 <i>yeaJ</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR236	AR3110 <i>ycgF</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR237	AR3110 <i>yddU</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR238	AR3110 <i>yddV</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR238	AR3110 <i>yddV</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR239	AR3110 <i>ydeH</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR240	AR3110 <i>yjcC</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR241	AR3110 <i>yfeA</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR242	AR3110 <i>yedQ</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR243	AR3110 <i>yfgF</i> ::scar	(Sarenko et al., 2017)
AR282	AR3110 Δ <i>csgB</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR3110	<i>bcsQ</i> , Cellulose-positives Derivat von W3110	(Sarenko et al., 2017)
AR331	W3110 <i>ylaB</i> ::scar	(Richter & Hengge, 2016)
AR333	W3110 <i>ycgG</i> ::scar	(Richter & Hengge, 2016)
BL21 C41 (DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Derivat <i>F</i> ⁻ <i>ompT gal dcm hsdS_B (r_B⁺ m_B)(DE3)</i>	(Miroux & Walker, 1996)
BS025	AR3110 <i>ylaB</i> ::scar, <i>rtn</i> ::scar	(Herbst et al., 2018)
BS027	AR3110 <i>ylaB</i> ::scar, <i>rtn</i> ::scar, <i>yjcC</i> ::scar	(Herbst et al., 2018)
BS139	W3110 <i>dsbA</i> ::scar	(Herbst et al., 2018)
BS146	W3110 <i>dsbB</i> ::kan	(Herbst et al., 2018)
BS147	AR3110 <i>ylaB</i> ::scar, <i>rtn</i> ::scar, <i>yjcC</i> ::scar, <i>ycgG</i> ::scar	(Herbst et al., 2018)
BS150	AR3110 <i>ylaB</i> ::scar, <i>rtn</i> ::scar, <i>yjcC</i> ::scar, <i>ycgG</i> ::scar, <i>yoaD</i> ::scar	(Herbst et al., 2018)
BS152	W3110 <i>dsbD</i> ::kan	(Herbst et al., 2018)
BS187	W3110 <i>degP</i> ::sac	(Herbst et al., 2018)
BS213	W3110 <i>pdeC</i> ::3xFLAG <i>degQ</i> ::scar, <i>degP</i> ::kan	(Herbst et al., 2018)
BS216	W3110 <i>degQ</i> ::scar	(Herbst et al., 2018)
BS217	W3110 <i>degP/Q</i> ::scar	(Herbst et al., 2018)
GB1100	W3110 λ RS45(<i>csgB</i> :: <i>lacZ</i>)	(Serra et al., 2015)
GB899	W3110 <i>yahA</i> ::scar	Laborsammlung
GB904s	W3110 <i>rtn</i> ::3xFLAG	(Sarenko et al., 2017)

Stammname	Genotyp / Beschreibung	Referenz
GB907s	W3110 <i>ycgG</i> ::3xFLAG	(Sarenko et al., 2017)
GK926s	W3110 <i>yjcC</i> ::3xFLAG	(Sarenko et al., 2017)
GK927s	W3110 <i>ylaB</i> ::3xFLAG	(Sarenko et al., 2017)
GK932s	W3110 <i>yoaD</i> ::3xFLAG	(Sarenko et al., 2017)
LM07	W3110 <i>pdeN</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM08	W3110 <i>pdeC</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM09	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM10	W3110 <i>pdeG</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM11	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM12	W3110 <i>pdeN</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar	Diese Arbeit
LM13	W3110 <i>pdeC</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar	Diese Arbeit
LM14	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar	Diese Arbeit
LM15	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar, <i>degQ</i> ::scar	Diese Arbeit
LM16	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar	Diese Arbeit
LM23	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar, <i>degQ</i> ::scar	Diese Arbeit
LM24	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::scar	Diese Arbeit
LM25	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::kan	Diese Arbeit
LM26	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG <i>dsbA</i> ::scar, <i>degQ</i> ::kan	Diese Arbeit
LM27	W3110 <i>pdeG</i> ::3xFLAG <i>degQ</i> ::kan	Diese Arbeit
LM29	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG <i>degQ</i> ::scar	Diese Arbeit
LM35	W3110 <i>degQ</i> ::scar, <i>dsbA</i> ::scar, <i>degP</i> ::kan	Diese Arbeit
LM36	W3110 <i>degQ</i> ::scar, <i>degP</i> ::scar, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM37	W3110 <i>degQ</i> ::scar, <i>degP</i> ::scar, <i>dsbA</i> ::scar	Diese Arbeit
LM38	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM39	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>dsbD</i> ::kan	Diese Arbeit
LM40	W3110 <i>pdeC</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM41	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM42	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG, <i>dsbD</i> ::kan	Diese Arbeit
LM43	W3110 <i>pdeG</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM44	W3110 <i>pdeG</i> ::3xFLAG, <i>dsbD</i> ::kan	Diese Arbeit
LM45	W3110 <i>pdeN</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM46	W3110 <i>pdeN</i> ::3xFLAG, <i>dsbD</i> ::kan	Diese Arbeit
LM47	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar	Diese Arbeit
LM48	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::kan	Diese Arbeit
LM49	W3110 <i>pdeB</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar, <i>degQ</i> ::kan	Diese Arbeit
LM50	W3110 <i>pdeC</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::scar, <i>degP</i> ::scar	Diese Arbeit
LM51	W3110 <i>pdeC</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::scar, <i>degP</i> ::scar, <i>dsbA</i> ::kan	Diese Arbeit
LM53	W3110 <i>pdeN</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::kan	Diese Arbeit
LM54	W3110 <i>pdeN</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar, <i>degQ</i> ::kan	Diese Arbeit
LM55	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar, <i>degQ</i> ::scar	Diese Arbeit
LM56	W3110 <i>pdeG</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar	Diese Arbeit
LM57	W3110 <i>pdeG</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::scar	Diese Arbeit
LM58	W3110 <i>pdeN</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::scar	Diese Arbeit
LM59	W3110 <i>pdeN</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar, <i>degQ</i> ::scar	Diese Arbeit
LM60	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG, <i>degQ</i> ::scar, <i>degP</i> ::kan	Diese Arbeit
LM61	W3110 <i>pdeD</i> ::3xFLAG, <i>dsbA</i> ::scar, <i>degQ</i> ::scar, <i>degP</i> ::kan	Diese Arbeit

Stammname	Genotyp / Beschreibung	Referenz
LM62	W3110 <i>pdeG::3xFLAG, dsbA::scar, degP::kan</i>	Diese Arbeit
LM63	W3110 <i>pdeG::3xFLAG, degQ::scar, degP::kan</i>	Diese Arbeit
LM64	W3110 <i>pdeN::3xFLAG, degQ::scar, degP::kan</i>	Diese Arbeit
LM65	W3110 <i>pdeN::3xFLAG, dsbA::scar, degQ::scar, , degP::kan</i>	Diese Arbeit
LM66	W3110 <i>pdeG::3xFLAG, dsbA::scar, degP::scar</i>	Diese Arbeit
LM67	W3110 <i>pdeG::3xFLAG, dsbA::scar, degP::scar, degQ::kan</i>	Diese Arbeit
LM68	W3110 <i>PdeB::FLAG dsbC::kan</i>	Diese Arbeit
LM68	W3110 <i>PdeB::FLAG dsbC::kan</i>	Diese Arbeit
LM69	W3110 <i>PdeC::FLAG dsbC::kan</i>	Diese Arbeit
LM69	W3110 <i>PdeC::FLAG dsbC::kan</i>	Diese Arbeit
LM70	W3110 <i>PdeD::FLAG dsbC::kan</i>	Diese Arbeit
LM71	W3110 <i>PdeG::FLAG dsbC::kan</i>	Diese Arbeit
LM72	W3110 <i>PdeN::FLAG dsbC::kan</i>	Diese Arbeit
LM73	W3110 <i>PdeB::FLAG dsbA::scar, degQ::scar, degP::scar</i>	Diese Arbeit
LM74	W3110 <i>PdeC::FLAG degQ::scar, degP::scar, dsbA::scar</i>	Diese Arbeit
LM75	W3110 <i>PdeD::FLAG dsbA::scar, degQ::scar, degP::scar</i>	Diese Arbeit
LM76	W3110 <i>PdeG::FLAG dsbA::scar, degP::scar, degQ::scar</i>	Diese Arbeit
LM77	W3110 <i>PdeN::FLAG dsbA::scar, degQ::scar, , degP::scar</i>	Diese Arbeit
NS069	W3110 <i>yegE::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
NS072	W3110 <i>ydaM::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
NS074	W3110 <i>ydiV::scar</i>	(Richter & Hengge, 2016)
NS252	W3110 <i>yaiC::lacZ</i>	(Sommerfeldt et al., 2009)
NS297	W3110 $\Delta lac(I-A)$, IRS45 <i>rtn::lacZ</i> (hybr.)	(Sommerfeldt et al., 2009)
NS350	W3110 <i>yjhH::scar</i>	Laborsammlung
OS65	W3110 <i>ycdT::scar</i>	Laborsammlung
OS66	W3110 <i>yedQ::scar</i>	Laborsammlung
OS67	W3110 <i>yfiN::scar</i>	Laborsammlung
OS68	W3110 <i>yeaI::scar</i>	Laborsammlung
SL109	GK1100 <i>lacIq $\Delta lac(Z-A)::scar csgB::lacZ \Delta mlrA$</i>	Laborsammlung
W3110	<i>E. coli</i> K12 <i>thyA36 deoC2 IN(rendered)I</i>	(Hayashi et al., 2006)

Tab. 6: Verwendete Bakteriophagen-Lysate

Phagenlysat	Phänotyp	Referenz
P1 W3110	Transduzierender Phage für W3110	Laborsammlung
P1 <i>dsbA::kan</i>	P1 Transduktion <i>dsbA::kan</i> für W3110	(Herbst et al., 2018)
P1 <i>dsbB::kan</i>	P1 Transduktion <i>dsbB::kan</i> für W3110	(Herbst et al., 2018)
P1 <i>dsbD::kan</i>	P1 Transduktion <i>dsbD::kan</i> für W3110	(Herbst et al., 2018)
P1 <i>dsbC::kan</i>	P1 Transduktion <i>dsbC::kan</i> für W3110	(Herbst et al., 2018)
P1 <i>degP::kan</i>	P1 Transduktion <i>degP::kan</i> für W3110	(Herbst et al., 2018)
P1 <i>degQ::kan</i>	P1 Transduktion <i>degQ::kan</i> für W3110	(Herbst et al., 2018)

Tab. 7: Verwendete Plasmide

Plasmidname	Phänotyp	Referenz
pBS6	pCAB18- <i>pdeC</i> -ORF	(Herbst et al., 2018)
pBS7	pCAB18- <i>pdeC</i> -ASS	(Herbst et al., 2018)
pBS8	pCAB18- <i>pdeC</i> -AAL	(Herbst et al., 2018)
pBS16	pCAB18- <i>pdeC</i> -ORF-6xHis	(Herbst et al., 2018)
pBS17	pCAB18- <i>pdeC</i> -ASS-6xHis	(Herbst et al., 2018)
pBS24	pCAB18- <i>pdeCEALΔC</i> -6His	(Herbst et al., 2018)
pBS25	pCAB18- <i>pdeC</i> -AAL-6xHis	(Herbst et al., 2018)
pBS54	pCAB18- <i>pdeC^{ΔC}</i> -6His	(Herbst et al., 2018)
pCAB18	IPTG-induzierbarer Überexpressionvektor mit <i>p_{tac}</i> kontrollierter MCS, Amp ^R	(Barembuch & Hengge, 2007)
pCP20	Hilfsplasmid mit FLP-Rekombinase, Promoter Temp.-induzierbar, Temp.-sensitives <i>ori</i> , Amp ^R ,	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKN5	pCAB18- <i>pdeG</i> -6xHis	Laborsammlung
pKN7	pCAB18- <i>pdeG</i> -TM2-EAL-Domäne	Laborsammlung
pKN8	pCAB18- <i>pdeG</i> -TM2-EAL-Domäne-6xHis	Laborsammlung
pKN9	pCAB18- <i>pdeG</i> -EAL-Domäne	Laborsammlung
pKN10	pCAB18- <i>pdeG</i> -EAL-Domäne-6xHis	Laborsammlung
pLM1	pCAB18- <i>pdeN</i> -ORF	Diese Arbeit
pLM2	pCAB18- <i>pdeN</i> -6xHis	Diese Arbeit
pLM3	pCAB18- <i>pdeN</i> -C76A	Diese Arbeit
pLM4	pCAB18- <i>pdeN</i> -C76A-6xHis	Diese Arbeit
pLM5	pCAB18- <i>pdeN</i> -ASS	Diese Arbeit
pLM6	pCAB18- <i>pdeN</i> -ASS-6xHis	Diese Arbeit
pLM7	pCAB18- <i>pdeN</i> -EVL/AVL	Diese Arbeit
pLM8	pCAB18- <i>pdeN</i> -EVL/AVL-6xHis	Diese Arbeit
pLM9	pCAB18- <i>pdeB</i> -ORF	Diese Arbeit
pLM10	pCAB18- <i>pdeD</i> -6xHis	Diese Arbeit
pLM11	pCAB18- <i>PdeN</i> -TM2-EAL-Domäne	Diese Arbeit
pLM12	pCAB18- <i>pdeN</i> -TM2-EAL-Domäne-6xHis	Diese Arbeit
pLM13	pCAB18- <i>pdeN</i> -EAL-Domäne	Diese Arbeit
pLM14	pCAB18- <i>pdeN</i> -EAL-Domäne-6xHis	Diese Arbeit
pLM15	pCAB18- <i>pdeN</i> -F2S-6xHis	Diese Arbeit
pLM16	pCAB18- <i>pdeN</i> -F2S-C76A-6xHis	Diese Arbeit
pLM17	pCAB18- <i>pdeN</i> -F2S-ASS-6xHis	Diese Arbeit
pLM18	pCAB18- <i>pdeB</i> -6xHis	Diese Arbeit
pLM19	pCAB18- <i>pdeD</i> -ORF	Diese Arbeit
pLM20	pCAB18- <i>pdeB</i> -ASS	Diese Arbeit

Plasmidname	Phänotyp	Referenz
pLM21	pCAB18- <i>pdeB</i> -ASS-6xHis	Diese Arbeit
pLM22	pCAB18- <i>pdeB</i> -AAL	Diese Arbeit
pLM23	pCAB18- <i>pdeB</i> -AAL-6xHis	Diese Arbeit
pLM24	pCAB18- <i>pdeB</i> -TM-EAL-Domäne	Diese Arbeit
pLM25	pCAB18- <i>pdeB</i> -TM-EAL-Domäne-6xHis	Diese Arbeit
pLM26	pCAB18- <i>pdeB</i> -EAL-Domäne	Diese Arbeit
pLM27	pCAB18- <i>pdeB</i> -EAL-Domäne-6xHis	Diese Arbeit
pLM28	pCAB18- <i>pdeD</i> -ASS	Diese Arbeit
pLM29	pCAB18- <i>pdeD</i> -ASS-6xHis	Diese Arbeit
pLM30	pCAB18- <i>pdeD</i> -AIL	Diese Arbeit
pLM31	pCAB18- <i>pdeD</i> -AIL-6xHis	Diese Arbeit
pLM32	pCAB18- <i>pdeD</i> -TM-EAL-Domäne	Diese Arbeit
pLM33	pCAB18- <i>pdeD</i> -TM-EAL-Domäne-6xHis	Diese Arbeit
pLM34	pCAB18- <i>pdeD</i> -EAL-Domäne	Diese Arbeit
pLM35	pCAB18- <i>pdeD</i> -EAL-Domäne-6xHis	Diese Arbeit
pLM36	pCAB18- <i>pdeG</i> -ATS	Diese Arbeit
pLM37	pCAB18- <i>pdeG</i> -ATS-6xHis	Diese Arbeit
pLM38	pCAB18- <i>pdeG</i> -AVL	Diese Arbeit
pLM39	pCAB18- <i>pdeG</i> -AVL-6xHis	Diese Arbeit
pLM40	pCAB18- <i>pdeG</i> -ORF	Diese Arbeit
pLM41	pCAB18- <i>pdeN</i> -cys-free-6xHis (C16S, C29S, C254S)	Diese Arbeit
pLM42	pCAB18- <i>pdeN</i> -cys-free-C76A-6xHis (C16S, C29S, C254S)	Diese Arbeit
pLM43	pCAB18- <i>pdeN</i> -cys-free-ASS-6xHis (C16S, C29S, C254S)	Diese Arbeit
pLM44	pCAB18- <i>PdeC-PdeN</i> -EAL-Fusion-6xHis	Diese Arbeit
pLM45	pCAB18- <i>pdeC-PdeB</i> -EAL-Fusion-6xHis	Diese Arbeit
pLM46	pCAB18- <i>pdeN</i> -6xHis mit PdeC-N-Terminus-6xHis	Diese Arbeit
pLM47	pCAB18- <i>pdeN</i> -F2S-I3G-6xHis	Diese Arbeit
pLM48	pCAB18- <i>pdeC</i> -TM1+Periplasmatische domäne(PP)-6xHis	Diese Arbeit
pLM49	pCAB18- <i>pdeC</i> -AxA-PP-6xHis	Diese Arbeit
pTJ9	pCAB18- <i>pdeC</i> -EAL-6xHis	Laborsammlung
pTJ11	pCAB18- <i>pdeC</i> -TM2-EAL-6xHis	Laborsammlung

3.5 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.5.1 Sterilisation

Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Flüssig- und Festmedien durch Autoklavieren bei 120 °C für 20 min und 209 kPa Überdruck sterilisiert. Für die Sterilisation von hitzeempfindlichen Lösungen wurden Cellulosefilter mit einer Porengröße von 0,22 µm verwendet.

3.5.2 Wachstumsbedingungen

Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Anzucht von Bakterienkulturen in Flüssig- oder Festmedien bei 28 °C bzw. 37 °C. Aerobes Wachstum in Flüssigkulturen wurde unter Agitation (150 – 250 rpm) gewährleistet.

3.5.3 Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme, ausgestrichen auf Festmedien, wurden maximal fünf Tage bei 4 °C aufbewahrt und genutzt. Für eine längerfristige Lagerung wurde eine Übernachtskultur mit 7 % DMSO versetzt und bei -80 °C eingefroren.

3.5.4 Antibiotika

Die Stammlösungen der Antibiotika wurden bei -20°C gelagert und in den unten angegebenen Konzentrationen verwendet (Tab. 8). Die Verdünnung erfolgte, soweit nicht anders angegeben, in H₂O.

Tab. 8: Liste der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin (AMP)	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	15 mg/ml in 70 % EtOH	15 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml

3.5.5 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zelldichte in Flüssigkulturen wurde photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm (OD₅₇₈) berechnet. Hierfür wurde steriles Referenzmedium als Nullabgleich verwendet. Ab einer OD₅₇₈ von mehr als 0,3 wurden die zu messenden Proben mit sterilem LB Medium verdünnt und die Zelldichte mittels des entsprechenden Verdünnungsfaktors berechnet. Ab dem oben genannten Wert verlaufen die OD₅₇₈ und die Zelldichte nicht mehr linear, die Messwerte repräsentieren nicht die tatsächliche Zelldichte.

3.5.6 Herstellung eines P1-Lysates

Die Übernachtskultur eines Bakterienstammes wurde 1:100 in frischem LB verdünnt und konnte bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 wachsen. Darauf folgte die Zugabe von einem Tropfen 1 M CaCl₂ und drei Tropfen *E. coli* W3110 P1-Wildtyp-Lysat. Nach erfolgter Zellyse (ca. 3 Std. bei 37 °C) wurde das Lysat mit ca. 10 Tropfen Chloroform versetzt und für 10 Min. bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles Schraubdeckelgläschen überführt und ebenfalls mit 2 bis 3 Tropfen Chloroform versetzt. Das so hergestellte Phagenlysat wurde über mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt und verwendet.

3.5.7 P1-Transduktion

Als Transduktion wird der Gentransfer zwischen Bakterien und Viruspartikeln bezeichnet. Bakterienspezifische Viren, auch Bakteriophagen genannt, können in der Mikrobiologie genutzt werden, um selektierbare Genabschnitte von einem Bakterienstamm in einen anderen Stamm desselben Hintergrunds zu übertragen. Hierfür wurde eine Übernachtskultur 1:100 in frischem LB-Medium verdünnt, für 2 Std. bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 inkubiert und mit einem Tropfen 1 M CaCl₂ versetzt. 0,5 ml dieser Kultur wurden dann in ein Reagenzglas überführt, mit 50 µl Phagenlysat vermischt und für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurde eine Kontrolle ohne Lysat erstellt. Die Ansätze wurden mit einem Tropfen 1M Natriumcitrat versetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnten die Ansätze auf entsprechende Selektionsplatten mit Natriumcitrat ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet werden. Die erzeugten Transduktanten wurden im Folgenden gereinigt und mittels Kolonie-PCR mit entsprechenden Test-Primern (Tab. 10) überprüft. Die erzeugten Bakterienstämme wurden, wie in 3.5.3 beschrieben, behandelt und gelagert.

3.5.8 Untersuchungen zur Biofilmbildung auf Festmedien

Für die Anzucht von Makrokolonie-Biofilmen wurden 5 µl einer Übernachtskultur des zu testenden Stammes auf ein entsprechendes Festmedium getropft. Die Inkubation erfolgte über mehrere Tage bei 37 oder 28 °C. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollten die Platten 2-3 Tage vor Versuchsbeginn hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert werden.

Kongorot und Coomassie-Brilliant Blue G dienen der Färbung extrazellulärer Proteine und Polysaccharide. Diese sind Hauptbestandteil der Biofilmmatrix und können über den Farbwechsel der Kolonie nachgewiesen werden (Hammar et al., 1995; Hammar et al., 1995). Die Inkubation von Makrokolonien erfolgte für 3-7 Tage bei 28 °C auf LBnoS oder YESCA-Medium mit Kongorotlösung (CR).

3.5.9 Entnahme von Proben aus Bakterienkulturen

Für diverse Analysemethoden, wie in 3.7.3 und 3.7.4 beschrieben war es notwendig zuvor Proben aus Bakterienkulturen gewachsen in Flüssigmedien oder auf Festmedien zu

entnehmen. Hierfür wurde steriles LB-Medium mit einer ausgewachsenen Übernachtskultur auf eine OD₅₇₈ von 0,05 beimpft und unter Agitation unter ausgewählten Temperaturen inkubiert.

In Western-Blot Experimenten für Proben aus Flüssigkulturen wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die OD₅₇₈ bestimmt und das Volumen für 200 µg Gesamtzellprotein berechnet (Formel 1) (Miller, 1972).

Formel 1: Berechnung des abzunehmenden Volumens für 200 µg Gesamtzellprotein aus der OD₅₇₈ (Miller, 1972)

$$\text{Volumen } [\mu\text{l}] = \left(\frac{\frac{200 \mu\text{g}}{107}}{\text{OD}_{578}} \right) \times 10^3$$

Die Bakterienzellen wurden pelletiert (10 Min., 4 °C, 12000 rpm) und anschließend in 80 µl 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen, so dass eine finale Konzentration von 2,5 µg/µl Gesamtzellprotein erreicht wurde. Abhängig vom untersuchten Protein kann die aufgetragene Menge Gesamtzellprotein für SDS-PAGE und Western-Blot Experimente deutlich variieren und wird deshalb in jedem Experiment separat angegeben.

Für die Probenentnahme aus Makrokolonien gewachsen auf Festmedien wurden, wie in 3.5.8 beschrieben, Makrokolonien auf LBnoS Agar ohne Zugabe von Kongorotlösung getropft. Nach einem und zwei Tagen wurde jeweils eine halbe Makrokolonie und nach drei Tagen ein Viertel einer Makrokolonie in 1x PBS resuspendiert, die OD₅₇₈ gemessen und, wie oben beschrieben, das Volumen für 200 µg Gesamtzellprotein gemessen, zentrifugiert und das Pellet in 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Für die Probenentnahme aus Makrokolonien wurden lediglich Stämme verwendet, die einen *E. coli* W3110 Hintergrund besitzen. Diese Stämme lassen sich auf Grund der nicht vorhandenen Celluloseproduktion deutlich besser resuspendieren als bspw. Stämme mit einem AR3110 Hintergrund.

Für Proben, die in β-Galaktosidase Experimenten eingesetzt werden sollten, wurde ebenfalls die OD₅₇₈ zum Zeitpunkt der Probenentnahme bestimmt und ein definiertes Volumen der Bakterienkultur in Abhängigkeit des zu untersuchenden Gens bei -30 °C eingefroren und am nächsten Tag verwendet.

3.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.6.1 Verwendete Kits

Für einzelne Anwendungen wurden während dieser Arbeit verschiedene Kits verwendet, um routinemäßige Arbeitsschritte zu standardisieren und zu beschleunigen. Die Verwendung der unten genannten Kits erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers.

Tab. 9: Verwendete Kits

Anwendung	Verwendetes Kit
Präparation von Plasmid DNA	innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 (Analytik Jena)
Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen	Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs® Inc.
Reinigung von PCR Produkten oder Restriktionsverdaus	Monarch® DNA Cleanup Kit (New England BioLabs® Inc.
Isolierung bakterieller chromosomaler DNA	InnuPREP Bacteria DNA Kit (Analytik Jena)

3.6.2 Verwendete Oligonukleotide

Alle Primer wurden nach dem Protokoll von Datsenko & Wanner (2000) konstruiert und bei Metabion synthetisiert (Datsenko & Wanner, 2000; Datsenko & Wanner, 2000).

Tab. 10: Primer zur Herstellung chromosomaler Knockout-Mutanten

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)	Verwendung
CsgD-fwd	ACCAGACAGTCATTCTTCTTGCCCGTCGCTGATTGCTG CGATATGTCTTGCGCA	Herstellung einer <i>csgD</i> Mutante in W3110
CsgD-rev	ACCAGACAGTCATTCTTCTTGCCCGTCGCTGATTGCTG CGATATGTCTTGCGCA	
W3110-dsbA-ATG (H1P1)	ATGAAAAAGATTGGCTGGCGCTGGCTGGTTTAGTTTT AGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Herstellung einer <i>dsbA</i> Mutante in W3110
W3110-dsbA-TAA (H1P2)	TTATTTTTTCTCGGACAGATATTTCACTGTATCAGCATA CTGCCATATGAATATCCTCCTTAGT	

Tab. 11: Primer zur Klonierung von Überexpressionsplasmiden.

Restriktionsschnittstellen wurden fett und alle mutierten Nukleotide kursiv dargestellt.

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)	Verwendung
Fwd-rtn-EcoR1	GAC GAATTC ATGTTTCATACGCGCTCCCAAT	Klonierung pCAB18-PdeN
Rev-rtn-Sall	GAC GTCGACTT ACCACTGCGGCGTATACGG	
rtn-Fwd-C76A	CCGCTGACCTTAGATACCGCCCAGCAAGCTAAC	Klonierung pCAB18-PdeN-C76A
rtn-Rev-C76A	GTTAGCTTGCTGGGCGG TATCTA AGGTCAGCGG	
rtn-Fwd-CSS-ASS	GATAAAAAACATT CGCTTC ATCTGCGACCGGT	Klonierung pCAB18-PdeN-ASS
rtn-Rev-CSS-ASS	ACCGGTCGCAGATGAAGCGAATGTTTTTTATC	
rtn-Fwd-EVL-AVL	CGAGTAACGGGCCTGGCAGTACTGCTACGCTGG	Klonierung pCAB18-PdeN-EVL
rtn-Rev-EVL-AVL	CCAGCGTAGCAGTACTGCCAGGCCCGTTACTCGC	
rtn-Rev-rtn-6HIS-Sall	GAC GTCGACTT AGTGATGGTGATGGTGATGCCACTGC GGCGTATACGG	Klonierung PdeN-Plasmid mit 6-His-Tag
ylaB-EcoR1-fwd	GAC GAATTC ATGCTGGTGAGAACACGACATC	Klonierung pCAB18-PdeB
ylaB-Sacl-rev	GAC GTCGACTC ACAAATGTTGCTCGGCCAGC	
ylaB-Sacl-6xHIS-rev	GCAG AGCTCT CAGTGATGGTGATAGTGATGCAAATGT TGCTCGGCCCA	Klonierung pCAB18-PdeB-6-His
ylaB-C76-A76-fwd	CAAGGCGCTG CCGCTAG CGAAGCCCAT	Klonierung pCAB18-PdeB ^{C75}
ylaB-C76-A76-rev	ATGGGCTTCGCTAGCGGCAGCGCCTTG	
ylaB-CSS-ASS-fwd	CGTCCCCAGG CTTC GTCTCTGGAGCA	

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)	Verwendung
ylaB-CSS-ASS-rev	TGCTCCAGAGACGAAGCCTGGGGAACG	Klonierung pCAB18-PdeB ^{ASS}
PdeB-EAL-AAL-fwd-new	TGTCGGTGCTGCGGCACTGGCGCGCTGGC	Klonierung pCAB18-PdeB ^{EAL}
PdeB-EAL-AAL-rev-	GCCAGCGCGCCAGTGCCGCAGCACCGACA	
yoaD-EcoR1-fwd	GAC GAATTC ATGCAAAAAGCACAACGGATC	Klonierung pCAB18-PdeD
yoaD-Sall-rev	GAC GTCTGACT TTAACGTAACGGCATAATGGGC	
yoaD-Sall-6xHis-rev	GAC GTCTGACT TTAGTGATGGTGATGGTGATGACGTAACGGCATAATGGGC	Klonierung pCAB18-PdeD-6-His-Variants
yoaD-C76-A79-fwd	TGGTCTGCCCCGCTCTGTGCCCC	Klonierung pCAB18-PdeD ^{C76}
yoaD-C76-A79-rev	GGGCGACAGAGGCGGGCAGACCA	
yoaD-CSS-ASS-fwd	CACACTTTATGCCTCCAGCATTTTTTGGTTA	Klonierung pCAB18-PdeD ^{ASS}
yoaD-CSS-ASS-rev	TAACCAAAAATGCTGGAGGCATAAAGTGTG	
yoaD-EIL-AIL-fwd	TATTGGTGTAGCGATTTTGCTGCGCTGGA	Klonierung pCAB18-PdeD ^{AIL}
yoaD-EIL-AIL-rev	TCCAGCGCAGCAAAATCGCTACACCAATA	
PdeN-TM1+EAL-EcoR1-fwd	GAC GAATTC ATGAACGATGTGTGGTACGCATTTTTAC	Klonierung pCAB18-PdeN ^{TM1-EAL}
PdeN-EAL-EcoR1-fwd	GAC GAATTC ATGCTGATGAGCGTACGTATGCGC	Klonierung pCAB18-PdeN ^{EAL}
PdeG-BamHI-fwd	GAC GGATCC ATGCGCAATACACTCATACC	Klonierung pCAB18-PdeG
PdeG-SacI-rev	GTC GAGCTC TAAGTCAACCAACCTTCA	
PdeG-SacI-6His-rev	GTC GAGCTC TAAGTCAACCAACCTTCA	Klonierung pCAB18-PdeG-6-His-Variants
PdeG-CTS-ATS-fwd-new	TAGTCTGGGCTACATCCCTGCCTG	Klonierung pCAB18-PdeD ^{ATS}
PdeG-CTS-ATS-rev-new	CAGGCAGGGATGTAGCCCAGACTA	
PdeG-EVL-AVL-fwd-new	GGGAGTTGCGGTGTTAGCCCCGT	Klonierung pCAB18-PdeD ^{AVL}
PdeG-EVL-AVL-rev-new	AGCGGGCTAACACCGCAACTCCC	
PdeB-TM2+EAL-fwd	GAC GAATTC ATGCAAGTCTTTATTTGGTTACCGC	Klonierung pCAB18-PdeB ^{TM1-EAL}
PdeB-EAL-fwd	GAC GAATTC ATGATTTTGCGCCGTATTCAGTCAC	Klonierung pCAB18-PdeB ^{EAL}
PdeD-EcoR1-TM2+EAL-fwd	GAC GAATTC ATGCAATTACCGCTGGCGGTGCTG	Klonierung pCAB18-PdeD ^{TM1-EAL}
PdeD-EcoR1-EAL-fwd	GAC GAATTC ATGGCTTACCGAATGAGCTTTTC	Klonierung pCAB18-PdeD ^{EAL}
NcoI-PdeN+ATG-fwd	GAC CCATGG ATGTTTCATACGCGCTCCCAATT	Klonierung pET15b-PdeN
PdeN-6His-NdeI-rev	GT CCATATG TTAGTGATGGTGATGGTGATGCCACTGCGCGTATACGGTTTCT	
fwd-yjcC-EcoR1	GAC GAATTC ATGAGTCATCGTGACGACAC	Klonierung pCAB18-PdeC- Fusionsproteine
PdeC/PdeN-Fusion-fwd	CTATTACTCTGGCTACGTATGCGCCCCGGCA	Klonierung pCAB18-PdeC/N-Fusionsprotein
PdeC/PdeN-Fusion-rev	TGCCGGGGCGCATACGTAGCCAGAGTAATAG	

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)	Verwendung
PdeC/PdeB-Fusion-fwd	CTATTACTCTGGCTAATTCAGTCACCGCATC	Klonierung pCAB18-PdeC/B-Fusionsprotein
PdeC/PdeB-Fusion-rev	GATGCGGTGACTGAATTAGCCAGAGTAATAG	
PdeC/PdeB-Fusion-C280S-fwd	TCGTGATATT7CGGTGCACTATC	Klonierung pCAB18-PdeC/B-C280S-Fusionsprotein
PdeC/PdeB-Fusion-C280S-rev	GATAGTGCACCGAAATATCACGA	
Fwd-rtn-EcoR1-I3G	GACGAATTCATGTCCGGCCGCGCTCCCAAT	Klonierung pCAB18-PdeN-I3G
PdeN-PdeC-N-term-fwd	GACGAATTCATGAGTCATCGTGACGACACAAGCTCC	Klonierung pCAB18-PdeN mit PdeC N-Term.
FW-P-K12-pdeG	TGCTTACCTGCA	
REV-K12-pdeG-EcoRI-P	ATGCGCAATACACTCATACC	Rückgrad-PCR für PdeG-Plasmide
	GAATTCTGTTTCCTGTGTGA	

Tab. 12: Sonstige Primer

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)	Verwendung
pTI2-1-1	GGCAAATATTCTGAAATGAGC	Test-PCR pCAB18
pTI2-1-2	GCGTTTCACTTCTGAGTTCC	
k1	CAGTCATAGCCGAATAGCC	Test Primer Kanamycin-Kassette
k2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	
T1 dsbA	CCGAGCAGCGGATGCAACTG	Test Primer <i>dsbA</i>
T2 dsbA	CGCAAATTCAGCCTGGTGTCC	
W3110-rpoS-Test-fwd	ATAACGACACAATGCTGGTCC	Testprimer <i>rpoS</i>
W3110-rpoS-Test-rev	GATTCAGTGCGTATTGGTGAC	
T1 degP	TATGACCGACCTCTATGCG	Testprimer <i>degP</i>
T2 degP	CACGTACCATGCGCATCATC	
T1 degQ	GAAGCCAGCAACGATCAGG	Testprimer <i>degQ</i>
T2 degQ	CGATGAGACGCCTGCCAGC	
T1 dsbA	CCGAGCAGCGGATGCAAC	Testprimer <i>dsbA</i>
T2 dsbA	AAATTCAGCCTGGTGTCC	
T1 dsbD	CTATGTACGGCACCAGAT	Testprimer <i>dsbD</i>
T2 dsbD	GCTTTTGTTTCGGCGGTTT	
rtn-Fwd-300bp-rtn-xhoI	GACCTCGAGATCGGCAACAATCAGTTTGTC	Klonierung PdeN-Fusionsproteine
PdeC+300bp-fwd	TTGTGAACTATATCACAAATTGA	Klonierung PdeC-Fusionsproteine
PdeB+300bp-fwd	CTGCCGCGCTGGTTGAAGCCA	Klonierung PdeB-Fusionsproteine

Tab. 13: Synthetisch hergestellte Fragment der Firma Integrated DNA Technologies

Name	Sequenz (5'-3' Richtung)	Verwendung
PdeN-EAL-EcoR1-Sal1	<p>GACGAATTCATGCTGATGAGCGTACGTATGCGCCCCGGCAG AGAAATCATGACCGCCATCAAGCGCGAACAATTTTACGTGGC GTATCAACCGGTGGTGGATACACAAGCTTTGCGAGTAACGGG CCTGGAAGTACTGCTACGCTGGCGGCATCCTGTCGCGGGAG AAATCCCCCGGATGCCTTCATTAACCTTTGCCGAATCGCAAAA GATGATTGTGCCGCTGACTCAGCACCTGTTTGAGTTAATTGC CCGCGATGCCGCAGAATTAGAAAAAGTGCTGCCGGTAGGCG TCAAATTTGGTATTAACATTGCGCCGGACCATCTGCACAGCG AAAGCTTTAAAGCAGATATCCAGAAACTGCTCACTTCCCTGCC CGCACACCATTTCCAGATTGTGCTGGAAATTACCGAGCGCGA TATGTTGAAAGAGCAAGAAGCCACACAACCTTTGCGCTGGCT GCACTCGGTCGGCGTAGAAATTGCTATTGATGACTTCGGCAC CGGGCACAGCGCGCTTATCTATCTTGAGCGTTTTACGCTCGA TTATCTGAAAATTGACCGTGGATTTATCAACGCCATCGGTACG GAAACGATCACTTCCCCCGTACTTGACGCGGTGCTGACGCTG GCGAAACGCCTCAATATGCTGACGGTTGCTGAAGGGGTGCA AACGCCGGAACAGGCGCGATGGCTAAGCGAACGCGGCGTTA ATTCATGCAAGGCTACTGGATTAGCCGCCCGTTACCGCTGG ACGATTTTGTCGCTGGCTAAAGAAACCGTATACGCCGCACT GGTAAGTGCGACGT</p>	Klonierung pCAB18- PdeN ^{EAL}
PdeN-cys-free-C76- CSS-EVL-6-His	<p>GACGAATTCATGTTTCATACGCGCTCCCAATTTTGGACGTAAG CTCCTGCTTACCTCCATTGTTGCAGGCGTAATGATTGCGATA CTGGTGAGTTCCCTTCAGTTTTTGTAGTGCCTGGCATAAGCAC GAAGTCAAATACGACACACGATTACCGACGTACAAAAGTATC TCGATACCTATTTTGCCGACCTGAAATCCACTACTGACCGGC TCCAGCCGCTGACCTTAGATACCTGCCAGCAAGCTAACCCCG AACTGACCGCCCGCGCAGCGTTTAGCATGAATGTCCGAACGT TTGTGCTGGTGAAAGATAAAAAAACATTCTGTTTCATCTGCGAC CGTGAGATGGACATTCCACTCAATGAATTGATTCCGGCGCTC GACATTAATAAAAACGTCGATATGGCGATCTTACCCGGCACG CCGATGGTGCCGAACAAACCCGCAATCGTCATCTGGTATCGC AACCCTTTGCTGAAAAATAGCGGCGTCTTTGCCGCTCTGAAT CTCAACCTGACGCCTTCACTCTTTTATAGTTACGGCAGGAA GATTACGATGGCGTCGCCCTCATTATTGGCAATACTGCGCTA TCTACCTTTTCTTCACGTTTGATGAACGTTAACGAATTAACCG ACATGCCAGTCCGTGAACTAAAATTGCGGGCATTCTCTGA CCGTTCCGGCTTTATGCAGATGACTGGACATGGAACGATGTGT GGTACGCATTTTTACTGGGCGGCATGAGTGGAAGTGTGCTTG GCCTGCTCTCCTATTACCTGATGAGCGTACGTATGCGCCCCG GCAGAGAAATCATGACCGCCATCAAGCGCGAACAATTTTACG TGGCGTATCAACCGGTGGTGGATACACAAGCTTTGCGAGTAA CGGGCCTGGAAGTACTGCTACGCTGGCGGCATCCTGTCGCG GGAGAAATCCCCCGGATGCCTTCATTAACCTTTGCCGAATCG CAAAAGATGATTGTGCCGCTGACTCAGCACCTGTTTGAGTTA ATTGCCCGCGATGCCGCAGAATTAGAAAAAGTGCTGCCGGTA GGCGTCAAATTTGGTATTAACATTGCGCCGGACCATCTGCAC AGCGAAAGCTTTAAAGCAGATATCCAGAAACTGCTCACTTCC CTGCCCGCACACCATTTCCAGATTGTGCTGGAAATTACCGAG CGCGATATGTTGAAAGAGCAAGAAGCCACACAACCTTTGCC TGGCTGCACTCGGTCGGCGTAGAAATTGCTATTGATGACTTC GGCACCGGGCACAGCGCGCTTATCTATCTTGAGCGTTTTACG CTCGATTATCTGAAAATTGACCGTGGATTTATCAACGCCATCG</p>	Klonierung PdeN C16S, C29S, C254S

Name	Sequenz (5'-3' Richtung)	Verwendung
	GTACGGAAACGATCACTTCCCCGTACTTGACGCGGTGCTGA CGCTGGCGAAACGCCTCAATATGCTGACGGTTGCTGAAGGG GTCGAAACGCCGGAACAGGCGCGATGGCTAAGCGAACGCG GCGTTAATTTTCATGCAAGGCTACTGGATTAGCCGCCCGTTAC CGCTGGACGATTTTGTTGCTGGCTAAAGAAACCGTATACGC CGCAGTGGCATCACCATCACCATCACTAAG GACGTC GAC	

3.6.3 Polymerasekettenreaktion

Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) können spezifisch Genfragmente amplifiziert werden. Hierbei werden sowohl Restriktionsschnittstellen oder beliebig andere DNA Sequenzen an die amplifizierten Genfragmente angehängt. Die PCR-Reaktionen laufen in kleinen Volumina von 50 µl Ansätzen nach den Angaben von (Sambrook & Maniatis, 1989) ab. Hierbei setzt sich ein PCR folgendermaßen zusammen: 0,5 - 1 µl DNA-Polymerase (2,5 U/µl), 1 mM dNTPs, 1x Polymerasepuffer (nach Angaben des Herstellers), je 1 µM Primer 1 & 2 und 1 µl gereinigte chromosomale oder Plasmid-DNA als Template. Für eine Kolonie-PCR wurde zuvor etwas Zellmaterial in 500 µl H₂O suspendiert und davon wurden 10 µl in einem PCR-Ansatz eingesetzt. Das Programm im PCR-Cycler wurde je nach Herstellerangaben zu der jeweiligen Polymerase und der Anlagerungstemperaturen der verschiedenen Primer angepasst.

3.6.4 Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt-PCR und Konstruktion von Niedrig-Kopienzahlvektoren

Die in dieser Arbeit benutzen Plasmide wurden auf der Basis des Niedrig-Kopienzahlvektor pCAB18 konstruiert, der einen *tac* Promoter, gefolgt von einer multiplen Klonierungsstelle, trägt (Barembuch & Hengge, 2007). C-terminale His-6-Tags wurden an die jeweiligen offenen Leserahmen ('*open reading frame*') der verwendeten Gene über eine PCR mit den in Tab. 11 gelisteten Primern hergestellt. Punktmutationen wurden über eine zwei-Schritt-PCR eingebracht. Hier wurden vier Primer verwendet, wobei zwei die jeweilige Mutation einbringen und die beiden anderen die stromauf- bzw. stromabwärts liegenden Genregionen flankieren und jeweils spezifische Restriktionsschnittstellen zur Klonierung in pCAB18 tragen. In einem ersten Schritt werden zwei separate PCR Fragmente generiert, die sich in der Region der einzubringen Mutation überlappen und die jeweiligen stromauf- bzw. stromabwärtsliegenden Bereich abdecken. In einem zweiten Schritt werden diese Fragmente in Kombination als PCR-Template mit den jeweiligen stromauf- bzw. stromabwärts Primern verwendet, um ein finales PCR Produkt zu generieren. Dieses Fragment trägt den gesamten DNA-Abschnitt mit der eingebrachten Mutation sowie den Restriktionsschnittstellen.

Ein ähnliches Protokoll wurde zur Generierung von chimären Konstrukten (PdeC/N) verwendet. Hier wurden zwei interne Primer verwendet, die die jeweilige Fusionsstelle determinierten.

3.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde verwendet, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Hierfür wurden die jeweiligen Proben zuerst mit 6 x DNA-Puffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0,8 %igen Agarosegel für 60 Min. bei 90 V in 1x TAE-Puffer. Als Größenabgleich wurde der 100bp-extended Marker (Roth) aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Agarosegel in GelRed gefärbt. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und kann mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden. Alle Agarosegele wurden mit Hilfe der in Kapitel 3.1 gelisteten Geldokumentationsanlage aufgenommen und analysiert.

3.6.6 Restriktionsverdau & Vektordephosphorylierung

Für den Restriktionsverdau wurden spezifische Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben bzgl. Puffer und Inkubationszeit und Temperatur verwendet. Für die Reinigung der Restriktionsansätze wurde das Monarch® DNA Cleanup Kit verwendet. Ein Restriktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Verdau eines PCR-Fragments	Verdau eines Vektors	Vektordephosphorylierung
30 µl gereinigtes PCR Fragment	10 µl Plasmid DNA	30 µl verdaute Plasmid-DNA
4 µl CutSmart® Puffer	2 µl CutSmart® Puffer	4 µl CutSmart® Puffer
0,5 µl je Restriktionsenzym	0,5 µl je Restriktionsenzym	1 µl CIP
5 µl H ₂ O	17 µl H ₂ O	5 µl H ₂ O

Nachdem der Vektor mit den spezifischen Restriktionsenzymen verdaut wurde, erfolgte eine Reinigung über Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gel-Extraktion. Darauf wurden die 5'- und 3'-Enden der verdauten Plasmid-DNA mit der alkalischen Phosphatase nicht-spezifisch dephosphoryliert, um die Religationsrate des Vektors deutlich zu verringern. Bevor der verdaute Vektor für die in 3.6.7 beschriebene Ligation eingesetzt werden konnte, wurde eine Reinigung des Ansatzes durchgeführt.

3.6.7 Ligation von Insert und Vektor

Für die Ligation eines DNA-Inserts und eines Vektors wurden beide Komponenten mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Die so entstandenen überlappenden Enden (*sticky ends*) können mit Hilfe der T4-Ligase zu einem geschlossenen Vektor ligiert werden. Um die

Ligationsrate zu erhöhen, erfolgte die Reaktion in einem PCR-Cycler, in dem 70-mal für jeweils 30 Sekunden die Temperatur von 10 °C auf 30 °C alternierte. Ein Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

11,5 µl gereinigtes PCR Fragment

1,5 µl Ligase-Puffer

1 µl verdauter und dephosphorylierter Vektor

1 µl T4-DNA-Ligase

3.6.8 Elektrokompente Zellen

Für die Herstellung von elektrokompenten Zellen wurde 1 L LB-Medium 1/100 mit einer Übernachtskultur eines Bakterienstammes beimpft, bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 inkubiert und zum Abkühlen auf Eis überführt. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 Min. mit 6000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ½ Volumen der Ausgangslösung in VE-Wasser gelöst. Der oben genannte Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Resuspensionsvolumen (H₂O + 10 % Glycerol) um 1/50 der Ausgangslösung verringert wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1/500 Volumen der Ausgangslösung in H₂O + 10 % Glycerol aufgenommen und in 100 µl Aliquots mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C dauerhaft gelagert.

Kompetente Zellen, die für die Ein-Schritt Inaktivierung von chromosomalen Genen in E. coli K12 nach Datsenko und Wanner verwendet wurden, mussten zuerst mit dem Temperatursensitiven pKD46 Plasmid, das für das λ-Red-Rekombinase System codiert, transformiert werden. Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Verfahren jedoch bei 28 °C. Zusätzlich wurde das pKD46 Plasmid nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 10 mM Arabinose für 30 Min. induziert, bevor die Zellen geerntet wurden.

3.6.9 Elektrotransformation

Um Vektoren oder Genfragmente in Bakterienzellen zu transformieren, wurde in dieser Arbeit neben der TSS-Transformation (siehe 3.6.10) die Elektrotransformation verwendet. Hierfür wurden, wie in 3.6.8 beschrieben, elektrokompente Zellen hergestellt, aus dem Stock aufgetaut und für die Elektrotransformation eingesetzt. 50 µl Zellen wurden mit einem bestimmten Volumen (0,5 – 6 µl), abhängig vom jeweiligen Produkt, in einer Elektroporationsküvette gemischt und im Elektroporator einem elektrischen Puls von 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω und einer Zeitkonstante von 4,5 – 5 ms ausgesetzt. Darauf wurden die Zellen in 500 µl vorgewärmten LB-Medium aufgenommen, für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Transformanten gereinigt.

3.6.10 TSS-Transformation

Mittels TSS-Transformation können ohne vorherige Herstellung kompetenter Zellen, aber mit geringerer Ausbeute, relativ schnell Plasmide in verschiedene Bakterienstämme eingebracht werden. Hierfür wurde eine Übernachtskultur 1/100 verdünnt und bis zu einer OD_{578} von 0,8 bei 37 °C inkubiert. 200 µl dieser Kultur wurden mit 200 µl 2x TSS auf Eis vermischt. Abhängig vom Plasmid wurde 0,5 – 5 µl Plasmid-DNA zugesetzt und auf Eis für 30 Min. inkubiert. Wiederum abhängig vom Plasmid wurden die Zellen bei 28 °C oder 37 °C für 60 – 90 Min. inkubiert und auf dem jeweiligen Selektionsmedium ausplattiert.

3.7 Biochemische Arbeitsmethoden

3.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine ihrer Größe nach getrennt werden. Hierfür wurden die Proben (wie in 3.5.9 beschrieben) in 1x SDS-Proben Puffer je nach Anwendung mit oder ohne Zugabe von DTT suspendiert. Je nach Zielprotein wurden Membranproteine 10 Min. bei 70 °C gefolgt 15 Min. bei 95 °C gekocht, um die Membranproteine aus der Membran zu lösen und die Bakterienzellen aufzubrechen. Bei cytosolischen Proteinen entfiel der 70 °C Inkubationsschritt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Proben auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit folgender Zusammensetzung aufgetragen:

Tab. 14: Zusammensetzung der Polyacrylamidlösungen zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen

Inhalt	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidanteil	12 %	4 %
Trenn- / Sammelgelpuffer	1,25 ml	0,625 ml
Polyacrylamidlg. 30%	2 ml	0,325 ml
H ₂ O	1,725 ml	1,535 ml
APS (10 %)	25 µl	17,5 µl
TEMED	2,54 µl	5 µl
Angewiesene Volumina für Trenn- und Sammelgel entsprechen der Menge, die für 1 kleines SDS-Polyacrylamidgele (5 x 10 cm) benötigt wird.		

Als Größenabgleich wurden die folgenden Proteinmarker verwendet:

Tab. 15: Verwendete Proteinmarker

Proteinmarker	Verdünnung / Volumen	Hersteller
Color Prestained Protein Standard (CPM)	unverdünnt	New England Biolabs
Enhanced Chemoluminescence (ECL)	10^{-2} / 5 – 10 µl	Thermo Scientific
Low Molecular Weight (LMW)	nach Angaben des Herstellers	New England Biolabs

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolge in SDS-PAGE Kammern bei 25 mA pro eingesetztem kleinen Gel für 90 Min.

3.7.2 Sensitive Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Die Färbung von SDS Gelen erfolgte mittels Coomassielösung. Hierfür wurden die Gele kurz in der Färbelsg. aufgekocht und für 20 Min. bei Raumtemperatur unten Agitation inkubiert. Das Entfärben erfolgte anschließend mit 10 %iger Essigsäure bis der gewünschte Entfärbungsgrad erreicht wurde.

So angefärbt, konnte unter zu Hilfenahme des Low Molecular Weight Marker (LMW, GE Healthcare) eine Quantifizierung von spezifischen Banden auf Grund der definierten Proteinmengen durchgeführt werden. 1 µl LMW Marker besteht aus 67 ng Phosphorylase B (97 kDa), 83 ng Albumin (66 kDa), 147 ng Ovalbumin (45 kDa), 83 ng Carbonanhydrase (30 kDa) und 80 ng Trypsin-Inhibitor (20,1 ng). Die Detektion erfolgte mittels CCD-Kamera. Für die Auswertung der Gele wurde die Software ImageQuant TL8.1 verwendet.

3.7.3 Immunoblot-Analyse (Western-Blot)

Nach erfolgreicher SDS-PAGE konnten Proben ebenfalls mittels Western-Blot weiter analysiert werden. Hierfür wurden die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran, die zuvor mit EtOH (p.a.) aktiviert und mit H₂O_{dd} gewaschen wurde, transferiert. Die PVDF-Membran wurde zusammen mit dem SDS-Gel und von Whatman-Papieren umschlossen in die jeweilige Blotting-Apparatur eingesetzt und für 75 Min. bei 100 V in kaltem Transblottpuffer geblottet. Darauf wurde die PVDF-Membran für mindestens 30 Min. bei RT oder über Nacht bei 4 °C in TBSTM geblockt. Der primäre Antikörper wurde nach Angaben des Herstellers oder AG-Erfahrungswerten verdünnt, zu der PVDF-Membran in TBSTM gegeben, für 2 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert und darauf 3-mal mit TBST gewaschen. Der sekundäre ECL-Antikörper inkubierte 1:60000 in TBSTM für 1 Std. bei Raumtemperatur. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Reagenz über die CCD-Kamera mit folgenden Einstellungen: *Increment*-Modus, Bild alle 30 Sek., hohe Auflösung

Tab. 16: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezifität	Hersteller
Primär:		
6-His Epitope Tag Antibody	Rabbit	Bethyl Laboratories Inc.
csgD	Mouse	Pineda Antikörper-Service
Monoclonal ANTI-FLAG®	Mouse	Sigma Aldrich
Sekundär:		
Pierce Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated	Anti-Mouse	Thermo Scientific
Amersham-ECL Anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody	from Donkey	GE Healthcare

3.7.4 Bestimmung der Genexpression mittels β-Galaktosidase-Assay nach Miller

Die Expression eines bestimmten Gens erfolgte über die Messung der spezifischen β-Galaktosidase Aktivität (Miller, 1972), die in µmol Substrat (ONPG) pro Minute, pro mg

Zellprotein (bestimmt über OD₅₇₈) angegeben wird. Hierfür wurde ein *lacZ*-Leserahmen, der für das Enzym β -Galaktosidase codiert, an stromaufwärts gelegene Regulationssequenzen fusioniert. Durch die Hydrolyse des synthetischen Substrats ONPG durch die β -Galaktosidase entsteht neben Galaktose der gelbfärbende Stoff o-Nitrophenol, der über die Extinktion bei 415 nm quantifiziert werden kann. Für die Messung der β -Galaktosidase Aktivität wurden Proben, wie in Kapitel 3.5.9 beschrieben, entnommen, erst zentrifugiert und mit einer entsprechenden Menge Z-Puffer aufgenommen. In kleinen Reagenzgläsern wurde ein angepasstes Probenvolumen mit 2 Tropfen 0,1 % SDS und Chloroform versetzt und gevortext. Die Enzymreaktion wurde nach Zugabe von 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) gestartet, mit 500 μ l 1 M Na₂CO₃ gestoppt und die Reaktionszeit notiert. Darauf wurden alle Proben für 10 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert, in Mikrotiterplatten überführt und die Extinktion bei 415 nm gemessen. Als Nullabgleich diente ein Ansatz ohne Zugabe von Zellmaterial. Die Berechnung der spezifischen β -Galaktosidase Aktivität erfolgte wie oben beschrieben.

3.8 ProteinProtein-basierte Methoden

3.8.1 Überexpression und Reinigung von löslichen Proteinen

Für die Überexpression wurde 1 L SOC Medium (100 μ g/ml AMP) mit einer Übernachtskultur des Stammes BL21 C41 transformiert, mit einem entsprechenden Plasmid auf eine OD₅₇₈ von 0,05 beimpft, bei 37 °C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,8 inkubiert und mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 4 Std. bei 37°C wurden die Zellen bei 6000 rpm für 15 Min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in Falcons überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und in 20 ml Lysis Puffer suspendiert. Der Aufschluss erfolgte dann mit der *French Press*, 2-3 Durchgänge mit 18000 psi). Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden für 40 Min. mit 19000 rpm bei 4°C zentrifugiert.

Für die Reinigung von 6x His getaggtten Proteinen wurde die Ni-NTA-Affinitätschromatographie angewandt. Die Ni-NTA wurde mit Waschpuffer äquilibriert, der Überstand auf die Säule gegeben, mit der Matrix vermischt und rollend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das gesamte Volumen auf eine Reinigungssäule gegeben. Die folgende Proteinreinigung fand bei 4 °C statt. Der Durchfluss wurde verworfen und die Matrix mit ca. 400 ml Waschpuffer gewaschen, bis eine OD₂₈₀ kleiner als 0,3 erreicht wurde. Anschließend wurde die Säule verschlossen, mit 4 ml Elutionspuffer versetzt und für 60 Min inkubiert.

inkubiert. Die Eluate wurden in 500 μ l Aliquots gesammelt. Zur experimentellen Überprüfung der Überexpression und Proteinreinigung erfolgte eine Probennahme vor IPTG-Induktion, 4 Std. nach Induktion, jeweils nach Zentrifugationsschritten aus dem Überstand und Pellet, aus dem Durchfluss, zwischen den Waschschritten und aus den Eluat. Alle Proben wurden in einem SDS-Gel der Größe nach getrennt und analysiert (siehe Kapitel 3.7.1 - 3.7.3).

3.8.2 Überexpression und Reinigung von Membran-Proteinen

Die Überexpression von Membranproteinen erfolgte, wie in 3.8.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass TB-Medium verwendet wurde. Nach der *French Press* wurden die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen bei 5000 rpm für 20 Min. pelletiert. Die Zellmembranen wurden darauf durch Ultra-Zentrifugation für 1 h bei 36000 rpm von den löslichen Proteinen getrennt. Das Membranpellet wurde in Solubilisierungspuffer homogenisiert und für zwei Std. bei 4°C rührend inkubiert. In einem zweiten Ultrazentrifugationsschritt wurden die solubilisierten Membranproteine von nicht-solubilisierten Bestandteilen getrennt. Der Überstand wurde mit Ni-NTA-Matrix über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht an die Matrix gebunden Proteine wurden am Folgetag durch Waschschriffe mit steigender Imidazolkonzentration ausgewaschen. Proteine, die an die Matrix gebunden haben, wurden darauf mit Elutionspuffer abgelöst und bei -80°C gelagert. Die Quantifizierung der gereinigten Proteine erfolgte, wie bereits in Kapitel 3.7.2 beschrieben, mit dem LMW-Marker.

3.8.3 Inkorporation von Membran-Proteinen in 'Nanodiscs'

Nanodiscs stellen ein synthetisches Modelmembransystem dar und können benutzt werden, um *in vitro* Studien an Membranproteinen durchzuführen. Sie bestehen aus einer nicht-kovalent verbundenen Phospholipid-Doppelschicht, die von zwei amphipathischen Gürtel-Lipoproteinen (MSP, *membrane scaffold protein*) umspannt wird. In diesem artifiziiellen System können verschiedenste Membranproteine rekonstituiert werden (Borch & Hamann, 2009; Ritchie et al., 2009). In dieser Arbeit wurde das Gürtelprotein MSP1D1 verwendet; hergestellt von Anja Richter (AG Prof. Dr. Tolker-Nielsen), das einen Nanodisc Durchmesser von 98 Å und eine Lipidfläche von 4400 Å² generiert (Bayburt & Sligar, 2010).

Um einen optimalen Einbau der Membranproteine in die Nanodiscs zu gewährleisten, wurden die jeweiligen Bestandteile Protein:MSP1D1:Lipid in einem Verhältnis von 1:3:1000 eingesetzt. In einem Rotationsverdampfer wurde zunächst die benötigte Menge an *E. coli* Total Lipid Extrakt (25 mg gelöst in 1 ml Chloroform) getrocknet und die präzise Lipidmenge anhand des Gewichts ermittelt. Die Lipide wurden in ND-Puffer unter Zugabe von 10 % DDM im Ultraschallbad für 1-5 Min. gelöst. Nach Zugabe des solubilisierten Membran- und Gürtelproteins wurde, um etwaige Lipidoxidation zu vermeiden, das Gemisch mit Stickstoff überschichtet und für eine Std. bei 4 °C inkubiert. Darauf wurden 1,5 g Bio-Beads™ SM-2 zugegeben und der Ansatz für zwei Std. bei 4 °C inkubiert, um ihm das Detergenz zu entziehen und die Ausbildung der Nanodiscs mit dem rekonstituierten Protein zu initiieren. Darauf wurde der Überstand in eine zuvor mit ND-Puffer äquilibrierte Ni-NTA-Matrix überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ni-NTA Matrix mit ND-Puffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte ebenfalls in ND-Puffer mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM. Um das Imidazol aus dem Eluat zu entfernen, wurde dieses mit Hilfe der PD-10-Säulen nach Angaben des Herstellers umgepuffert. Die

Proteinkonzentration des eingesetzten Proteins und des Gürtelproteins wurde mittels des LMW Markers bestimmt (Kapitel 3.7.3). Anhand des Verhältnisses der Proteinkonzentration von Membranprotein zu MSP1D1 ist es möglich, abzuschätzen, wie viele Membranproteine in eine Nanodisc rekonstituiert wurden. Eine Übersicht über die Ansätze zur Rekonstitution von PdeC^{WT}, PdeC^{EALΔC} und PdeC/N finden sich in Tab. 17.

Tab. 17: Ansätze zu Rekonstitution von PdeC^{WT}, PdeC^{EALΔC} und PdeC/N in Nanodiscs

Komponenten	Gewicht [mg]	Volumen [μl]	Stoffmenge in 1 μl [nmol]
PdeC ^{WT} : 1	0,143	500	3,4
MSP1: 3	0,2614	127,5	10,2
Lipid: 1000*	3,06	364,60	3400
PdeC ^{EALΔC} : 1	0,1455	500	4,38
MSP1: 3	0,363	164,3	13,14
Lipid: 1000*	3,95	469,5	4380
PdeC/N: 1	0,183	500	4,7
MSP1: 3	0,358,7	175	14,1
Lipid: 1000*	4,24	504, 3	4700

* in ND-Puffer

3.8.4 Nachweise enzymatischer Aktivität von PDEs

Die enzymatische Aktivität von in Nanodiscs rekonstituiertem PdeC^{WT}, PdeC^{EALΔC} und PdeC/N wurde mit einer Proteinkonzentration von 63 nM getestet. Die Ansätze wurden zunächst mit 200 mM DTT und, wenn notwendig, mit 6,5 mM DTT versetzt. Nach Zugabe von [α -³²P]-c-di-GMP wurden jeweils Proben nach Inkubationszeiten von 30, 60, 90 und 120 Min. bei 30 °C genommen. Nach erfolgter Inkubation wurden jeweils 5 μl Probe mit 5 μl EDTA (0,5 mM) versetzt, um die Reaktion zu stoppen. Die Produkte wurden später auf Dünnschichtchromatographieplatten aufgetragen und in einer Kammer mit Laufmittel (gesättigtes NH₄SO₄ und 1,5 M KH₂PO₄, pH 3,6, 1:1,5 v/v) für ca. 2-3 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Dünnschichtchromatographieplatten getrocknet und zur Exposition auf IP-Platten gelegt. Die Entwicklung erfolgte mit dem Typhoon Reader.

3.9 Datenbanken

Folgende Datenbanken dienen der Analyse von Genen und Proteinen sowie ihrer Sequenzen:

- CBS prediction server (www.cbs.dtu.dk)
- EcoCyc (www.ecocyc.org)
- ExPASy (www.expasy.org)
- NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- PFAM (www.pfam.xfam.org)
- UniProt (www.uniprot.org)

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der CSS-Domäne von PdeC als DSB/Thiol-Schalter

Zu Beginn dieser Arbeit konnte genetisch gezeigt werden, dass PdeC über den DSB/Thiol-Schalter seiner periplasmatischen CSS-Domänen reguliert wird. Um diese Regulation der PdeC Aktivität auch biochemisch zu zeigen, wurde das Membranprotein PdeC in Detergenz gereinigt und in eine simulierte native Umgebung, den Nanodiscs, rekonstituiert. Nanodiscs bestehen aus sich selbst assemblierenden, scheibenförmigen Lipiddoppelschichten, die wie mit einer Schnur von einem Gerüstprotein umspannt werden und so den gesamten Komplex stabilisieren. Jeweils zwei Gerüstproteine wickeln sich um die Phospholipid-Doppelschicht, so dass in diesem Bereich Membranproteine eingelagert werden können (Bayburt & Sligar, 2010; Borch & Hamann, 2009; Ritchie et al., 2009).

4.1.1 PdeC^{EALΔC} und PdeC/N sind aktive Phosphodiesterase

PdeC besitzt, neben den beiden periplasmatischen noch drei weitere Cysteine in der cytoplasmatischen EAL Domäne. Im Gegensatz zu *in vivo* Experimenten können diese Cysteine *in vitro* Kreuzreaktionen hervorrufen. Die Reinigung unter teilweise oxidativen Bedingungen kann die Cysteine der EAL-Domäne oxidieren und zur Ausbildung von DSBs führen. Auch die Verwendung des Reduktionsmittels DTT im Reaktionsmedium könnte die enzymatischen Reaktionen durch Reduktion der Cysteine beeinflussen. Um diesen Einflüssen entgegen zu wirken, wurden verschiedene Varianten von PdeC konstruiert: (1) In der Variante PdeC^{EALΔC} wurden alle Cysteine der EAL Domäne durch Serin-Reste ausgetauscht (C285S, C299S und C489S). Die Veränderung der Aminosäureprimärstruktur stellt einen Eingriff in die Struktur der EAL-Domäne dar und könnte auch die Funktionalität des PdeC beeinflussen. Aus diesem Grund wurde parallel (2) ein Fusionsprotein PdeC/N entworfen, das aus der TM1-CSS-TM2 von PdeC und der EAL Domäne von PdeN besteht. Die EAL Domäne von PdeN enthält von Natur aus keine Cysteine und schließt somit Auswirkungen auf die PDE-Aktivität durch eine strukturelle Veränderung aus. Die so konstruierten Varianten von PdeC wurden auf den Niedrigkopienzahlvektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert. Selbst ohne Verwendung des entsprechenden Induktors IPTG zeigte dieser Vektor unter eine geringe Basalexpression und eignet sich deshalb für die Simulation der natürlichen chromosomalen Expression der CSS-Domänen-PDEs.

Da sich Makrokolonien sehr gut eignen, um die Aktivität von DCG und PDE *in vivo* zu untersuchen, wurden die konstruierten PdeC-Varianten auf ihre PDE-Aktivität in Makrokolonien getestet. Hierbei diente die charakteristische c-di-GMP-abhängige Matrixproduktion, gefärbt mit dem Biofilmmatrixfarbstoff Kongorot, als Indikator. Flache und breite Makrokolonien mit großen Falten und Stegen kennzeichnen die Produktion von pEtN-Cellulose und amyloiden Curli-Fasern. Die Aktivität einer DGC wird über eine gesteigerte c-di-GMP-Produktion auch die Matrixmenge erhöhen. Die Kolonien werden breiter und flacher, die

Falten und Stege größer. Eine PDE zeigt den gegenteiligen Effekt. Die Makrokolonien verlieren, aufgrund zunehmender PDE-Aktivität und niedriger c-di-GMP-Produktion, sukzessive ihre Matrixproduktion. Führt die Überproduktion einer PDE zu vollständigem Verlust der Matrixproduktion, bleiben die Kolonien klein und flach und der Biofilmmatrixfarbstoff Kongorot kann nicht binden, so dass die Kolonien weißlich erscheinen (Serra et al., 2013a).

Zeigen die beiden konstruierten Varianten PdeC^{EALΔC} und PdeC/N wie PdeC^{WT} eine verminderte Matrixproduktion, kann davon ausgegangen werden, dass die neuen Konstrukte für die geplanten PDE-Aktivitätsversuche verwendet werden können.

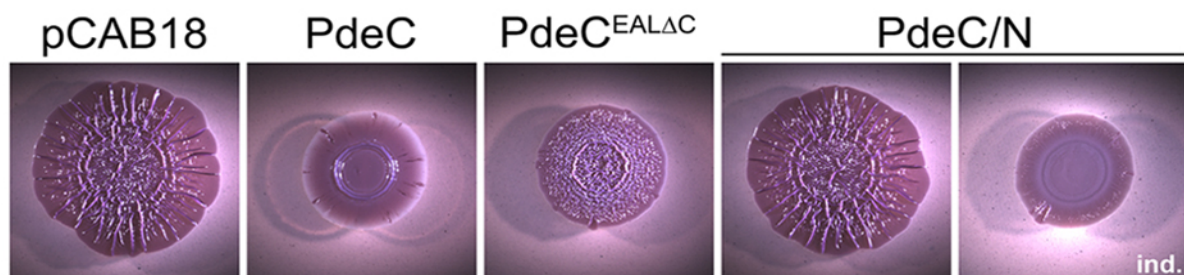


Abb. 6: PdeC^{EALΔC} und PdeC/N sind aktive Phosphodiesterasen

PdeC sowie die Varianten PdeC^{EALΔC} und PdeC/N wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in *E. coli* K12 AR3110 mittels TSS übertragen. Die Makrokolonien wurden auf LB_{noS} Medium unter Zugabe des Biofilmmatrixfarbstoffes Kongorot und 100 µg/ml Amp über fünf Tage bei 28 °C inkubiert. Dem Wachstumsmedium wurde, wenn angegeben, 0,1 mM IPTG zugegeben (ind.) (Herbst et al., 2018).

Sowohl PdeC^{EALΔC} als auch PdeC/N zeigen über die Verminderung der Matrixproduktion, eine eindeutige PDE-Aktivität. Die Aktivität von PdeC/N ist zwar im Vergleich zu PdeC^{WT} und PdeC^{EALΔC} deutlich geringer, jedoch konnte die Induktion mit 0,1 mM IPTG die PDE-Aktivität deutlich machen. Somit eignen sich die konstruierten PdeC-Varianten für weitere *in vitro* Versuche zur Ermittlung der Redox-sensitivität der PDE Aktivität.

4.1.2 Gereinigtes PdeC zeigt eine Redox-abhängige Phosphodiesterase-Aktivität in Nano-Discs

Die Reaktionsgeschwindigkeit der gereinigten und in Nano-Discs rekonstituierten Membranproteine PdeC, PdeC^{EALΔC} und PdeC/N gegenüber radioaktiv-markiertem c-di-GMP wurde untersucht (Abb. 7). Im Gegensatz zu PdeC^{WT} besitzen rekonstituierte PdeC^{EALΔC} und PdeC/N eine basale PDE Aktivität auch in Abwesenheit von DTT. Die Zugabe von DTT stimuliert die Abbaugeschwindigkeit des c-di-GMP durch PdeC^{EALΔC} und PdeC/N, was sich durch das Auftreten des enzymatischen Abbauproduktes 5' pGpG (Abb. 7A) und in einer Abnahme der Radioaktivität des c-di-GMP in den Spots (Abb. 7B) äußert. Die Reduktion in der CSS-Domäne von PdeC zur Form mit freien Thiolen stimuliert deutlich die PDE-Aktivität der EAL Domäne.

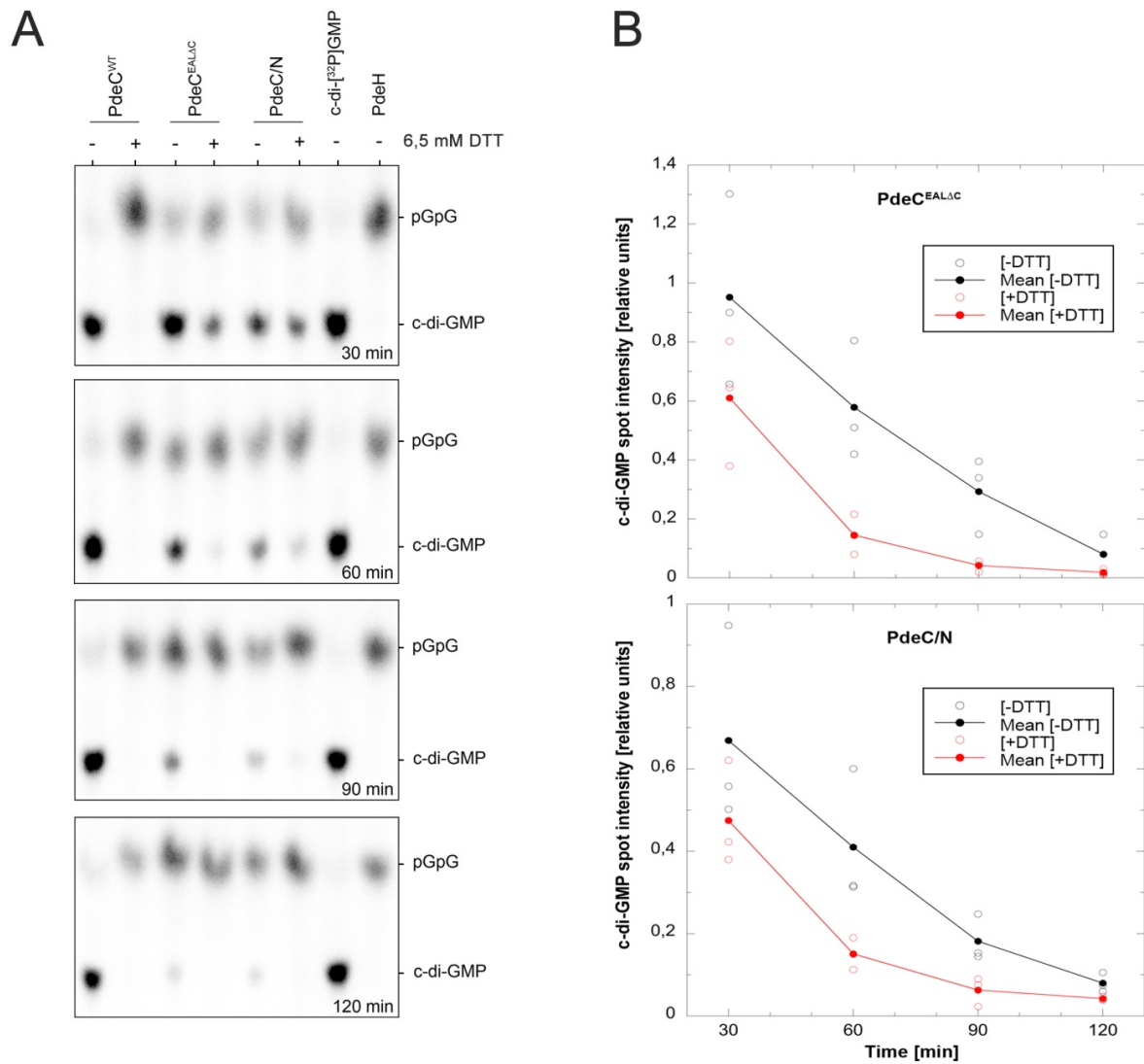


Abb. 7: Gereinigtes PdeC zeigt eine Redox-abhängige PDE-Aktivität in Nano-Discs

(A) Die in Detergenz gelösten und gereinigten PdeC Varianten wurden in Nano-Discs rekonstituiert und auf ihre PDE-Aktivität in An- und Abwesenheit des Reduktionsmittels DTT überprüft. Die Proben wurden nach 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommen. Das radioaktiv-markierte Substrat c-di-GMP und das enzymatische Abbauprodukt 5'-pGpG wurden mittels Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie detektiert. Als Kontrolle wurde die sehr stark aktive PdeH verwendet. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis wird hier gezeigt. **(B)** Die Quantifizierung des radioaktiv markierten c-di-GMP Spots erfolgte aus den drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Normalisierung der Messwerte erfolgte auf Basis der c-di-GMP-Spot Kontrolle, welche über die Zeit keine Veränderung der Intensität zeigte. Die offenen Symbole zeigen die einzelnen Datenpunkte und die ausgefüllten Symbole die jeweiligen Mittelwerte in Abwesenheit (Schwarz) und Anwesenheit von DTT (Rot). Die Abbildung aus der Publikation von Herbst et al. 2018 wurde modifiziert.

4.2 Vergleichende Analyse der CSS-Phosphodiesterasen aus *Escherichia coli* K12

Für PdeC und PdeB konnte bereits eine DsbA-vermittelte DSB Bildung und eine DegP/DegQ-abhängige proteolytische Prozessierung nachgewiesen werden (Herbst et al., 2018). Aber auch die restlichen drei CSS-Domänen-PDEs (PdeD, PdeG und PdeN) weisen die charakteristischen, hoch konservierten periplasmatischen Cysteine in ähnlichen Bereichen ihrer CSS-Domäne mit Potential zur Ausbildung einer DSB auf.

Durch eine funktionelle und vergleichende Analyse aller CSS-Domänen-PDEs sollen mögliche Unterschiede in Funktion und im Wirkungsmechanismus aufgezeigt und die Frage beantwortet werden, warum *E. coli* K12 fünf Proteine mit einem sehr ähnlichen strukturellen Aufbau benötigt.

4.2.1 Die CSS-Phosphodiesterasen zeigen eine hohe Varianz in der Aminosäureabfolge der CSS-Domäne

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der fünf *E. coli* K12 CSS-Domänen-PDEs (Abb. 8) zeigt, dass die Sequenz kaum konserviert ist. Einzig die Cysteine an Position 79 und 110 liegen komplett konserviert vor. Das hoch konservierte und namensgebende CSS-Motiv (Cystein-Serin-Serin) liegt an Position 110-112. In Einzelfällen wie PdeG finden sich Motivänderungen von CSS zu CTS. Ob der Austausch des Serins (S) zu einem Threonin (T) in Bezug auf die Ausbildung einer DSB Auswirkungen haben könnte, ist unwahrscheinlich, da beide Aminosäuren ähnliche chemische Eigenschaften besitzen.

Vereinzelte konservierte Aminosäuregruppen in unmittelbarer Nähe der periplasmatischen Cysteine gefunden werden. An den Positionen 58, 69 und 105 des Aminosäureabgleichs (Abb. 8) liegen polare Aminosäuren wie Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Glutamin (Q) und Glutaminsäure (E). An Position 87 dominieren hingegen die unpolaren und lipophilen Aminosäuren Leucin (L) und Methionin (M). Ebenso interessant ist das mit Ausnahme von PdeN hoch konservierte Glycin (G) an Position 76 und das, mit Ausnahme von PdeG, konservierte Alanin (A) an Position 82 des Aminosäuresequenz-Abgleichs in Abb. 8. Auch erwähnenswert sind auftretende gruppenbezogene Konservierungsmuster an den Positionen 91 und 92 (Alanin, unpolar), 98 (Arginin, polar) und 115 (Glycin, unpolar). An diesen Stellen tragen PdeD, PdeG und PdeN die gleichen Aminosäuren, PdeB und PdeC hingegen nicht. Diese gruppenbezogenen Konservierungsmuster könnten für die Redox-Eigenschaften der einzelnen CSS-Domänen-PDEs von Bedeutung sein.

Auch die Länge des periplasmatischen Loops, der durch die DSB zwischen den beiden Cysteinen entsteht, variiert innerhalb der CSS-Domänen-PDEs. Für PdeB, PdeC und PdeG beträgt die Distanz 30, für PdeD und PdeN nur 29 Aminosäuren.

Die katalytisch aktive EAL Domäne zeigt hingegen eine insgesamt deutlich höhere Anzahl an konservierten Aminosäuren. Von einer Inaktivität durch Variationen der Aminosäuresequenz

kann nicht ausgegangen werden, da alle essentiellen Aminosäuren für die c-di-GMP Bindung, Katalyse sowie Co-Faktor-Bindung (Abb. 8, rote, blaue und grüne Sterne) vorhanden sind (Spurbeck et al., 2012).

Vereinzelte sind auch im EAL-Motiv Unterschiede festzustellen. PdeD besitzt ein EIL- und PdeG sowie PdeN ein AVL Motiv. Voraussichtlich hat dies aber keinen Einfluss auf die Fähigkeit c-di-GMP zu binden (Galperin, 2005).

Die beiden hoch konservierten Cysteine an Position 79 und 110 sind jedoch nicht die einzigen Cysteine der CSS-Domänen-PDEs (Abb. 8, rote Boxen). Auf Grund der Fähigkeit DSBs auszubilden, können ebendiese Cysteine verschiedenste Auswirkungen, unter anderem auf die Stabilität der Proteine, haben.

Auch der N-Terminus der CSS zeigt im Vergleich eine hohe Variabilität der Aminosäuren. Beispielweise ist bei PdeB und PdeG an Position 2 ein Arginin (R), bei PdeC ein Serin (S), bei PdeD ein Glutamin (Q) und PdeN ein Phenylalanin (F) zu finden.

Die Aminosäuresequenzen von PdeB, PdeC, PdeD, PdeG und PdeN wurden mit Hilfe des MultAlin Algorithmus verglichen (Corpet, 1988). Hoch konservierte Aminosäuren (< 90 %) werden in rot und weniger, aber dennoch signifikant konservierte Aminosäuren (< 60 %) werden in hellrot dargestellt. Konsensussequenzen, die chemisch oder strukturell nah verwandt sind, werden durch folgende Symbole gekennzeichnet: ! (Valin oder Isoleucin), \$ (Leucin oder Methionin), # (Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin, Glutaminsäure) Die für die Funktion der Proteine relevanten und hoch konservierten Cysteine im periplasmatischen Loop sind gelb unterlegt. Alle weiteren Cysteine werden durch eine rote Box gekennzeichnet. Die hydrophoben Regionen, die die transmembranen Domänen (TM1 und TM2) widerspiegeln, umschließen die CSS-Domäne und wurden unterstrichen (ermittelt mit TMHMM server v. 2.0) (Daley et al., 2005). Bedeutung der Sterne: Schwarz: Positionen der eingebrachten Punktmutationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden; Blau: Essentielle Aminosäuren für die Bindung von c-di-GMP; Rot: Essentielle Aminosäuren für die Bindung des Cofaktors Mg²⁺; Grün: Essentielle Aminosäuren für die katalytische Aktivität des Proteins (Spurbeck et al., 2012). Abbildung wurde modifiziert aus (Herbst et al., 2018).

4.2.2 Chromosomale Expression der CSS-Phosphodiesterasen in *Escherichia coli* K12

Um die chromosomale Expression der CSS-Domänen-PDEs zu analysieren, wurden die Daten von Sarenko et al. (2017) reproduziert und vergleichend für die CSS-Domänen-PDEs dargestellt (Abb. 9). Die so gewonnenen Daten wurden mit den Expressionsdaten der CSS-Domänen-PDEs aus der Publikation von Sommerfeldt et al. (2009) verglichen.

PdeB, PdeC, PdeD und PdeG werden RpoS-abhängig exprimiert (Klauck et al., 2018; Sommerfeldt et al., 2009), wohingegen PdeN auch in Abwesenheit von RpoS exprimiert wird, so dass eine vegetative Expression von PdeN in Abhängigkeit von RpoD wahrscheinlich ist. Dies bestätigt auch die Western-Blot Analyse der chromosomal FLAG getaggten CSS-Domänen-PDEs. Bis auf PdeN produzieren alle CSS-Domänen-PDE über Nacht deutlich mehr Protein, zudem wird die Abhängigkeit der Expression von RpoS unterstützt. PdeN erreicht mit 0,06 die höchste spezifische β -Galaktosidaseaktivität, gefolgt von PdeB und PdeC mit 0,015 und 0,024 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und PdeD und PdeG mit nur 0,008 und 0,005 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Serra et al., 2013a; Sommerfeldt et al., 2009).

Demgegenüber fällt die PdeN-Proteinkonzentration unerwartet gering aus (Abb. 9). Sie liegt in den über Nacht Proben etwa gleichauf mit der von PdeC, PdeD und PdeG, liegt aber deutlich unter der von PdeB.

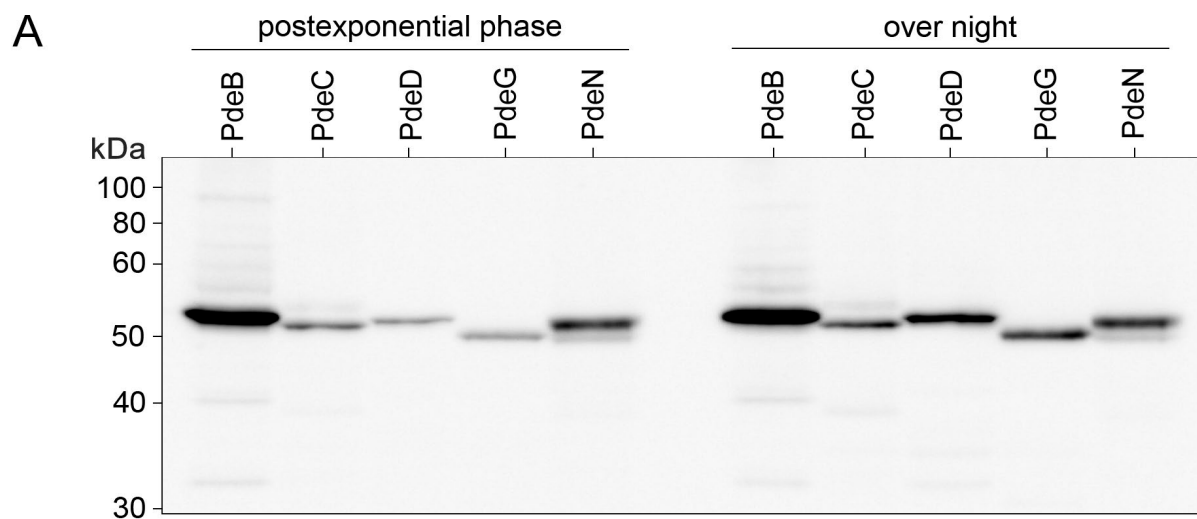


Abb. 9: Chromosomale Expression der CSS-Domänen-PDEs in Flüssigkulturen

(A) Derivate des Stammes W3110, die chromosomal codiertes und C-terminal 3 x FLAG getaggte Varianten der CSS-Domänen-PDEs exprimieren, wurden bei 28 °C in LB-Medium inkubiert. Die Probennahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten in der post-exponentiellen Phase (OD 2 und 3) und über Nacht. Die Detektion erfolgte durch Immunodetektion der FLAG-Tags.

Die hier beschriebenen Unterschiede zwischen der chromosomalen Expression und der experimentell bestimmten Proteinlevel der CSS-Domänen-PDEs zeigen bereits, dass trotz des ähnlichen Aufbaus der CSS-Domänen-PDEs unterschiedliche post-translationale Regulationsmechanismen zum Tragen kommen könnten.

4.2.3 Aktivitätsmuster der fünf CSS-Phosphodiesterasen

Für einen Vergleich der CSS-Domänen-PDEs in *E. coli* K12 wurden zunächst, analog zu Herbst et al. (2018) verschiedene Varianten der CSS-Domänen-PDEs auf den Niedrigkopienzahl-Vektor pCAB18 kloniert. Die jeweiligen offenen Leserahmen der CSS-Domänen-PDEs stehen unter Kontrolle des RpoD-abhängigen *tac* Promoters. Auf Grund der geringen zellulären Kopienzahl wird das klonierte Gen nur moderat überproduziert und so eine Annäherung an die natürliche Expression des CSS-Domänen-PDEs erreicht. Transkriptionelle Regulationsmechanismen werden hier nicht berücksichtigt. Es kann aber über IPTG die Expression des Gens experimentell induziert und erhöht werden. Dieses System eignet sich, um Variationen in der Aminosäureabfolge des Proteins zu analysieren.

Für alle Varianten der CSS-Domänen-PDEs wurden Konstrukte hergestellt, die analog zu denen, beschrieben für PdeC (WT-Version, ASS-Variante und AAL-Variante), hergestellt wurden. Zusätzlich wurden Teilproteine konstruiert, die aus der TM2-Domäne und der EAL Domäne (TM2-EAL) sowie der einzelnen EAL-Domäne (EAL) bestanden. Wie beschrieben unterscheiden sich das CSS- und EAL-Motiv innerhalb der CSS-Domänen-PDEs (Kapitel 4.2.1). Die genannten Bezeichnungen sind für alle analysierten Proteine aus Gründen der Übersicht standardisiert worden. Auswirkungen der Konstrukte der CSS-Domänen-PDEs auf die Morphologie der Makrokolonien zeigt (Abb. 10).

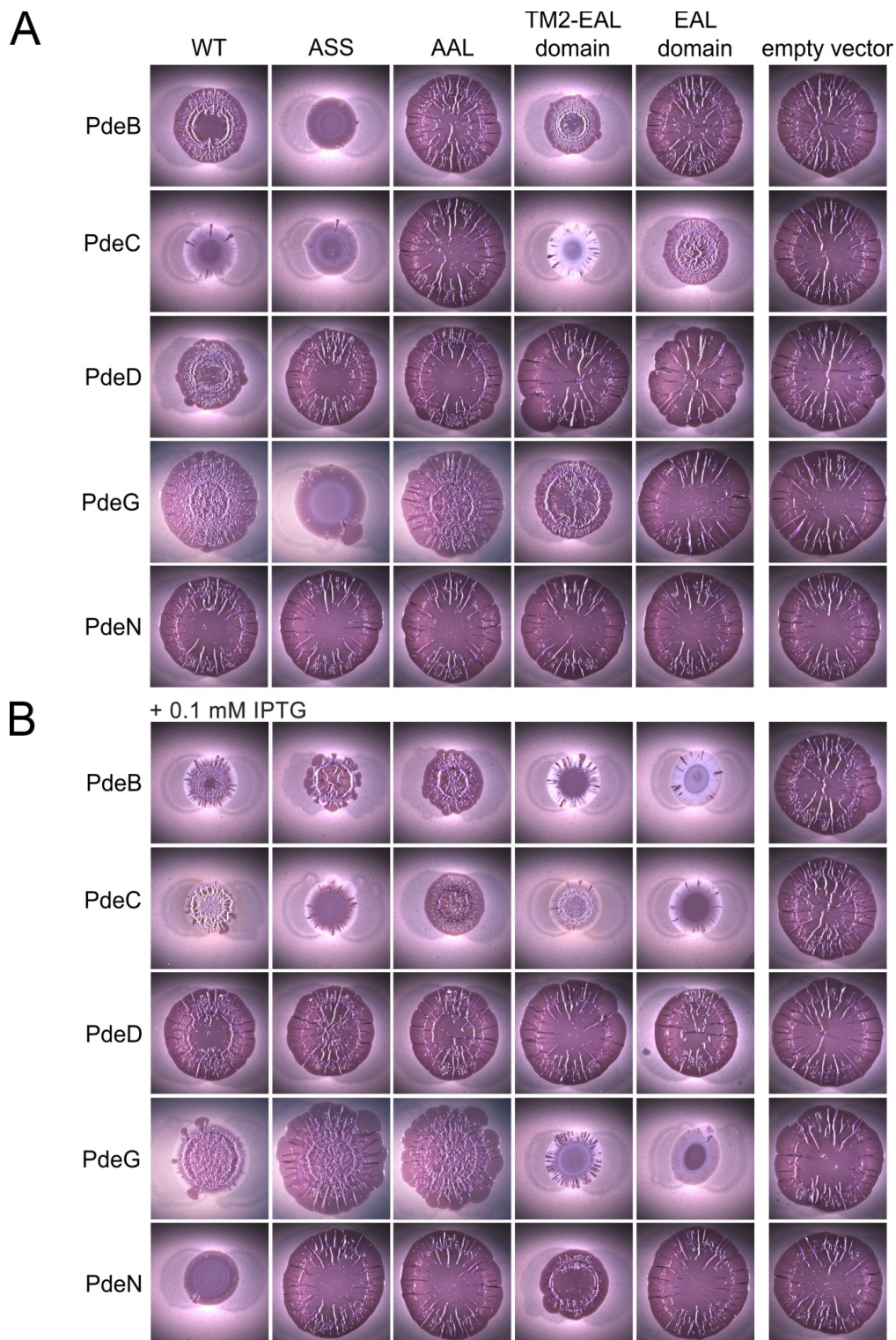


Abb. 10: Auswirkungen der CSS-Domänen-PDEs und deren Varianten auf die Makrokoloniemorphologie

(A) Die verschiedenen Versionen der CSS-Domänen-PDEs wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promotors kloniert und in den *E. coli* K12 AR3110 Stamm mittels TSS übertragen. Die Makrokolonien wurden auf salz-freiem LB Medium unter Zugabe des Biofilmmatrixfarbstoffes Kongorot und 100µg/ml AMP für fünf Tage bei 28 °C inkubiert. WT: Wildtyp CSS-Domänen-PDE; ASS: Cystein im CSS-Motiv durch ein Alanin ersetzt; AAL: Für PDE-Aktivität essentielle Aminosäure Glutaminsäure wurde durch ein Alanin ersetzt; TM2-EAL-domain: CSS-Domänen-PDE ohne TM1 und CSS-Domäne; EAL-domain: EAL Domäne der jeweiligen CSS-Domänen-PDE; empty vector: Leerplasmid ohne Insert.; für jede verwendete Agarplatte wurde eine Leerplasmidkontrolle mitgeführt **(B)** Überproduktion der verschiedenen Varianten der CSS-Domänen-PDEs durch Induktion des *tac* Promotors mit 0,1 mM IPTG.

Über die Veränderung der Matrixproduktion einzelner Makrokolonien können Rückschlüsse auf die Aktivität der jeweiligen CSS-Domänen-PDE gezogen werden (Abb. 10). Als Kontrollen dienen hierbei die katalytisch inaktiven Varianten (AAL) und der jeweilige Leervektor. Da alle Kontroll-Varianten keinen Einfluss auf die Matrixproduktion der Makrokolonien zeigen, bestätigen die beobachteten Effekte die katalytische Aktivität der EAL-Domäne der CSS-Domänen-PDE. Über eine Reduktion der Matrixproduktion werden diese als aktive PDEs charakterisiert. Die reduzierte Matrixproduktion der Wildtyp-CSS-Domänen-PDEs (WT) von PdeB, PdeC und PdeD und PdeG wird durch eine höhere PDE-Aktivität bedingt. PdeN zeigt nicht induziert geringe bis gar keine Veränderungen der Makrokoloniemorphologie (Abb. 10A). Erst durch Induktion des Vektors mit 0,1 mM IPTG wird das jeweilige Produkt überproduziert. Eine erhöhte PDE-Aktivität schlägt sich in der Reduktion der Matrixproduktion nieder (Abb. 10B).

Die katalytisch inaktiven Varianten (AAL) von PdeB, PdeC und PdeG weichen nach Induktorzugabe in ihrer Aktivität deutlich von der Kontrolle mit dem Leervektor nach Induktorzugabe ab und zeigen eine geringe PDE-Aktivität. Als Ursache für dieses Phänomen wird die Einlagerung des überproduzierten Proteins in Einschlusskörpern diskutiert, die mit vermindertem Zellwachstum einhergehen kann (Sevier & Kaiser, 2002).

Durch Mutagenese eines der konservierten Cysteine im CSS-Motiv (ASS) können keine DSB im Periplasma ausgebildet werden. Anhand dieser Mutanten lassen sich die CSS-Domänen-PDEs in zwei Gruppen unterteilen. ASS-Varianten von PdeB, PdeC und PdeG zeigen eine deutliche Steigerung der PDE-Aktivität (geringere Matrixproduktion, aktivierbare CSS-Domänen-PDEs), PdeD und PdeN zeigen den gegenteiligen Effekt. Hier zeigt sich die PDE-Aktivität verringert (erhöhte Matrixproduktion, nicht aktivierbare CSS-Domänen-PDEs).

Ebenfalls wurden die TM2-EAL und EAL Domänen der CSS-Domänen-PDEs allein analysiert, um die Auswirkung der generierten Fragmente zu simulieren (Abb. 10). Die TM2-EAL Domänen von PdeB, PdeC und PdeG zeigen deutliche PDE Aktivität, wohingegen die TM2-EAL-Domänen von PdeD und PdeN keine Veränderung der Koloniemorphologie aufweisen und somit geringe bis keine PDE-Aktivität anzeigen. Daher spiegelt sich die oben beschriebene Gruppierung auch in diesen Konstrukten nieder. Durch Induktion des pCAB18-*tac*-Promoters reduziert sich die Matrixproduktion deutlich. Die Überproduktion des Produkts erhöht die Aktivität der TM2-EAL Fragments von PdeN.

Nicht induziert zeigen bis auf PdeC alle EAL-Domänen sehr geringe PDE Aktivitäten. Erst durch Induktion des Vektors wird die PDE-Aktivität von PdeC und PdeG deutlich. Die Überproduktion der EAL-Domäne von PdeD und PdeN führt zu keinen bzw. geringen Veränderungen der Koloniemorphologie und folglich auch kaum PDE-Aktivität.

Anhand der beschriebenen Ergebnisse konnte eine Gruppierung der CSS-Domänen PDEs inaktivierend (PdeB, PdeC und PdeG) und inaktivierend (PdeD und PdeN) beobachtet werden.

4.2.4 Redox-induzierte proteolytische Prozessierung

Um die Proteinlevel der verschiedenen CSS-Domänen-PDEs zu vergleichen, wurden Varianten mit C-terminalen 6-His-Tag auf pCAB18 generiert. Die Durchführung der Immunoblots erfolgte unter nichtreduzierenden Bedingungen, um mögliche Änderungen des Laufverhaltens durch einen veränderten Redoxstatus der Proteine auszuschließen. Am Beispiel von Lysozym konnte bereits gezeigt werden, dass die kompaktere Proteinstruktur, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken entsteht, auch das Laufverhalten des Proteins in SDS-Gelen ändert (Pitt-Rivers & Impiombato, 1968). Herbst (2018) zeigte bereits für PdeC eine Differenz von ca. 10-15 kDa zwischen der berechneten und der experimentell im Western Blot bestimmten Größe (siehe Tab. 18) (Herbst & Hengge, 2018).

Tab. 18: Proteingrößen der verwendeten CSS-Domänen-PDE Konstrukte inklusive 6-His Tag

	Proteingröße [kDa]				
PDE	Wildtyp	ASS	AVL	TM2-EAL	EAL
PdeB	59,6	59,6	59,6	32,52	30,07
PdeC	61,6	61,6	61,6	35,44	31,85
PdeD	60,6	60,6	60,6	34,03	31,77
PdeG	57,8	57,8	57,8	33,31	31,11
PdeN	59,4	59,4	59,4	33,38	30,86

Alle Abweichungen der experimentell bestimmten Proteingrößen in liegen in dem für PdeC bestimmten Bereich von ca. 10-15 kDa. Verantwortlich für die Abweichungen ist vermutlich die Kombination des Markers, bestehend aus löslichen Proteinen, mit einer veränderten SDS-Bindung bei Membranproteinen (Rath et al., 2009).

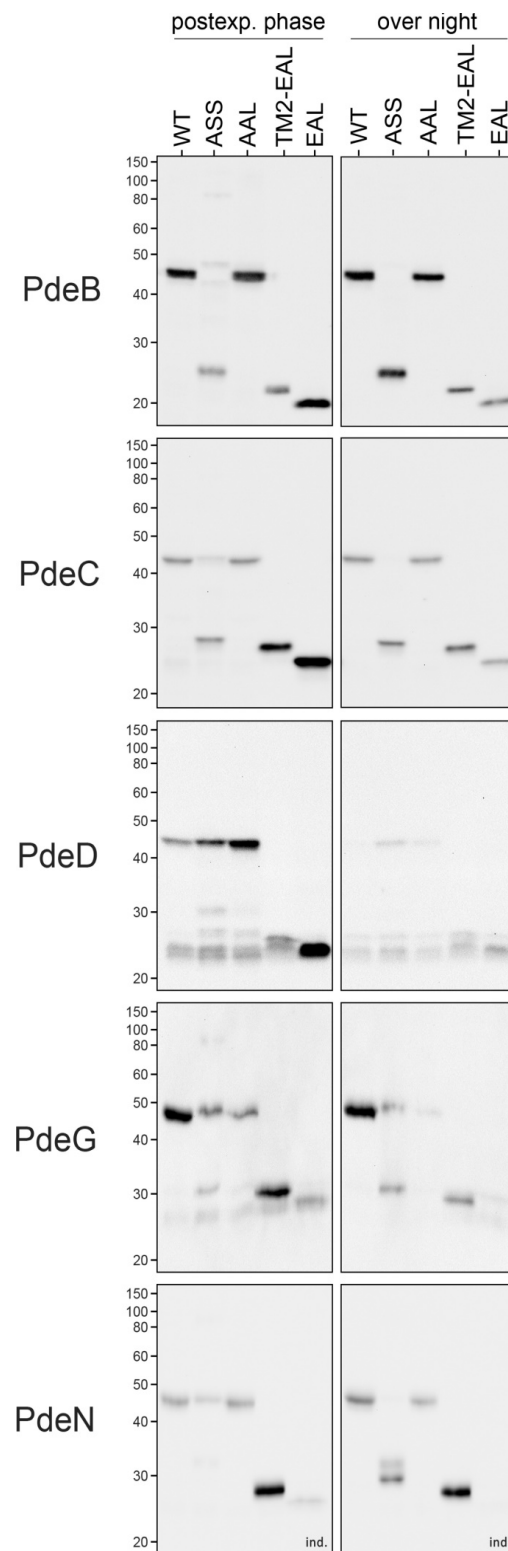


Abb. 11: Vergleich der Proteolysemuster der verschiedenen CSS-Domänen-PDE Varianten in Flüssigkultur

Die verschiedenen Versionen der CSS-Domänen-PDEs mit C-terminalen 6-His-Tag, wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den *E. coli* K12 W3110 Stamm mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden bei 28 °C inkubiert und die Probenentnahme erfolgte während der post-exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ zwischen 2 – 3) und über Nacht. Alle PdeN Proben wurden ab einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 0,1 mM IPTG induziert (ind.). Die Probenmengen werden separat in Abb. 12 dargestellt. Die CSS-Domänen-PDE Varianten wurden anschließend durch Immunoblotting detektiert. Die in dieser Abbildung gezeigten Western-Blots wurden nicht in einem experimentellen Ansatz analysiert. Dies sollte bei Vergleich der CSS-Domänen-PDEs untereinander berücksichtigt werden.

Eine quantitative vergleichende Analyse der Bandengrößen ist für Abb. 11 nicht möglich. Es muss berücksichtigt werden, dass sich die Mengen des Proteins in µg, notwendig zur Detektion im Western Blot, innerhalb der CSS-Domänen-Proteine deutlich unterscheiden. Eine Darstellung ebendieser Unterschiede wird in Abb. 11 veranschaulicht.

Alle WT und ASS Varianten der CSS-Domänen-PDE sind als stabile einzelne Banden nachweisbar. Für alle ASS-Varianten wurden zusätzlich zu den WT Banden, weitere Banden auf der Höhe von ca. 25-30 kDa detektiert. Diese sind auf proteolytische Prozessierung zurückzuführen. In der post-exponentiellen Phase ist die Proteolyse der ASS-Varianten noch nicht abgeschlossen (WT Protein mit Banden bei ca. 50 kDa detektierbar). Eine annähernd vollständige Proteolyse wurde für PdeB, PdeC und PdeN über Nacht beobachtet.

Die Banden der TM2-EAL-Fragmente laufen etwas tiefer als die 30 kDa-Bande der ASS-Variante. Somit scheint die Schnittstelle der Proteasen in der periplasmatischen Domäne zu liegen. Die EAL-Domänen laufen ein Stück tiefer bei ca. 20 kDa.

Die Expression von PdeB, PdeC, PdeD und PdeG erfolgt auf Grund des *tac* Promoters von pCAB18 in diesem Setup RpoD-abhängig und nicht wie ursprünglich in Abhängigkeit von RpoS. Der Beginn der Expression erfolgt RpoD-abhängig bereits in der post-exponentiellen Wachstumsphase. Die WT und AAL Varianten von PdeB, PdeC, PdeG und PdeN werden über Nacht nur gering bis gar nicht abgebaut. Hingegen zeigen alle Konstrukte von PdeD starke Instabilität. Über Nacht konnten PdeD^{WT}, PdeD^{ASS} und PdeD^{AVL} nur schwach und PdeD^{TM2-EAL} und PdeD^{EAL} gar nicht detektiert werden.

Konstrukte, die nur die TM2-EAL oder nur die EAL Domäne besitzen, sind über Nacht im Vergleich zur post-exponentiellen Phase deutlich reduziert, was für einen fortlaufenden Abbau spricht (Ausnahme PdeN^{TM2-EAL}).

Wie bereits oben erwähnt, werden die Probenmengen (Loading [µg]) vergleichend für alle Konstrukte der CSS-Domänen-PDEs in Abb. 12 gezeigt. Die zur Detektion im Western-Blot notwendigen Proteinmengen lassen Rückschlüsse auf die Induktion der Konstrukte zu.

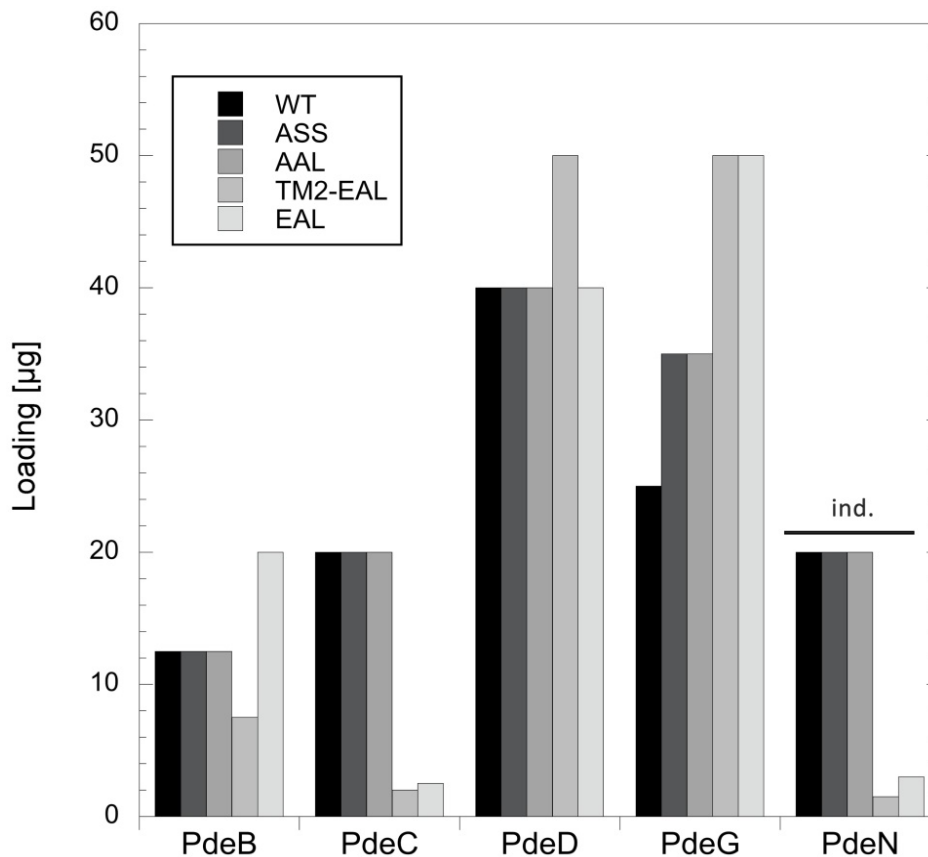


Abb. 12: Probenmengen der CSS-Domänen-PDEs zur Western Blot Analyse

Die hier dargestellten Probenmengen beziehen sich auf die in Abb. 11 dargestellte Western-Blot Analyse. Die Berechnung der Mengen erfolgte wie in Kapitel 3.5.9, Formel 1 beschrieben. Über die aufgetragenen Probenvolumina konnten die jeweiligen Mengen an Proteinen in μg berechnet werden. Alle PdeN Proben wurden mit 0,1 mM IPTG induziert (markiert durch ind.).

Es ist anzunehmen, dass die Menge des aufgetragenen Proteins für eine Detektion im Western-Blot (Abb. 12) mit der Menge Zielproteins in der Probe korreliert. Im Falle der CSS-Domänen-PDEs ist die Menge vermutlich bedingt durch die Redox-induzierte proteolytische Prozessierung. Insofern charakterisieren geringe Probenmengen (0,2 – 20 μg bei PdeB und PdeC) höhere Induktion der Zielproteine. Hohe Probenmengen von 40 – 50 μg (PdeD und PdeG) weisen auf geringere Proteininduktion hin. Da PdeN im Western-Blot nur über die Induktion mit IPTG nachweisbar ist, kann ebenfalls von einer sehr geringen Induktion des Proteins ausgegangen werden.

Anhand der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich die CSS-Domänen-PDEs in ihrem Proteolysemuster nur geringfügig unterscheiden und sich folglich auch der Regulationsmechanismus ähneln muss. Die Induktion der Proteine unterscheidet sich deutlich voneinander und kann mit der Redox-induzierten proteolytischen Prozessierung der CSS-Phosphodiesterasen in Verbindung gebracht werden.

4.2.5 Proteolyse als Antwort der auf einen veränderten Redox-Status der konservierten Cysteine

Die Prozessierung von PdeC erfolgt als Antwort auf einen veränderten Redox-Status im Periplasma. Experimentell wird dies durch Zugabe des Reduktionsmittels DTT simuliert (Herbst & Hengge, 2018; Herbst et al., 2018). Mit Hilfe Plasmid-codierter Wildtyp CSS-Domänen-PDEs sowie chromosomal codierter 3x FLAG getaggter Varianten sollen die Auswirkungen der Veränderung des Redox-Status untersucht werden.

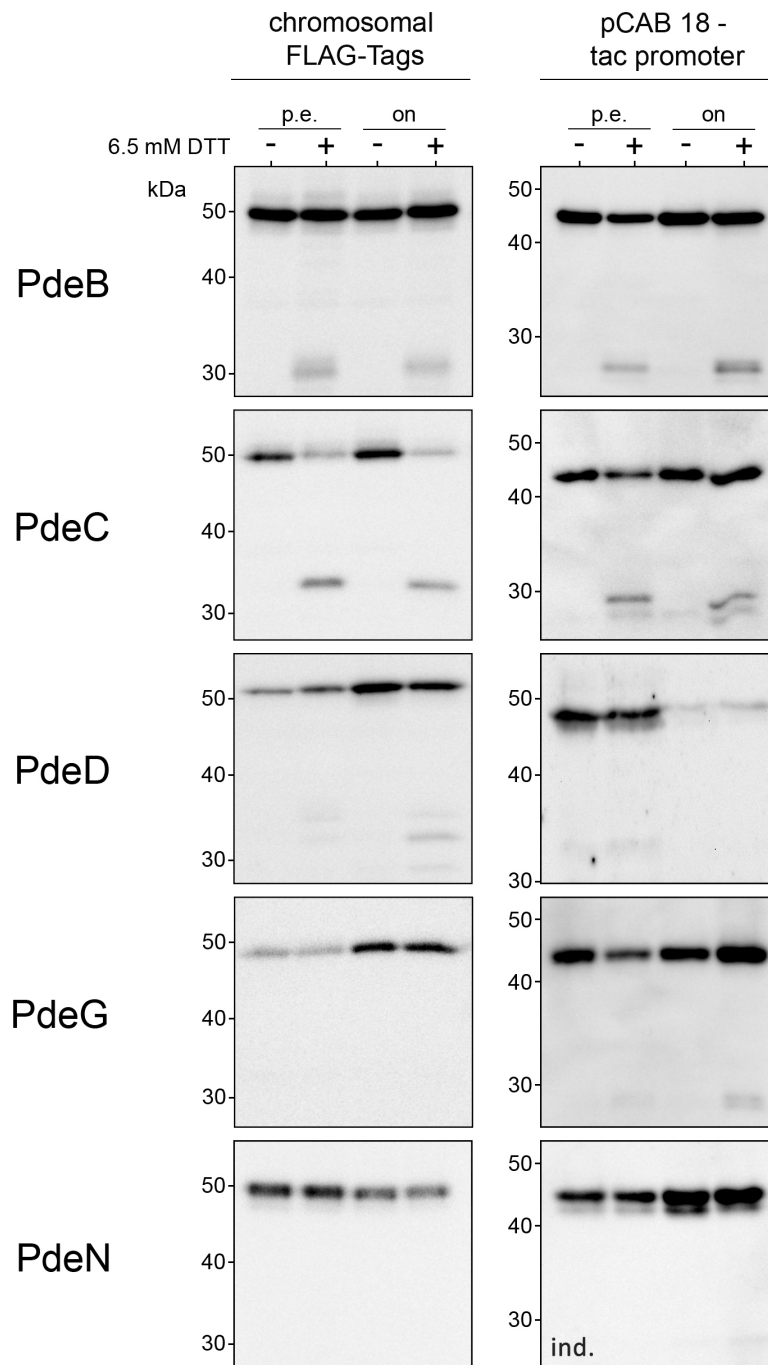


Abb. 13: Prozessierung der CSS-Domänen-PDEs als Antwort auf den veränderten Redox-Status der konservierten Cysteine

Die CSS-Domänen-PDE^{WT} Proteine mit C-terminalen 6-His-Tag, wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den *E. coli* K12 W3110 Stamm mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden bei 28 °C inkubiert, die Probenentnahme erfolgte während der post-exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ zwischen 2 – 3, p.e.) und über Nacht (on). Zusätzlich wurden Kulturen der Stämme mit chromosomalen C-terminalen 3x FLAG-Tags angesetzt. Die Plasmid-codierten PdeN Proben wurden ab einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 0,1 mM IPTG induziert (ind.). Probenmengen FLAG-Tags: PdeB 12,5 µg; PdeC 25 µg; PdeD 30 µg; PdeG 35 µg; PdeN 20 µg, Probenmengen pCAB18: PdeB 12,5 µg; PdeC 20 µg; PdeD 60 µg; PdeG 12,5 µg; PdeN 7,5 µg. Die jeweiligen CSS-Domänen-PDE Varianten wurden anschließend durch Immunoblotting detektiert. Die hier dargestellten Banden wurden in Abhängigkeit von der Detektion (FLAG-Tags oder His-Tags) jeweils auf einem Blot generiert, jedoch variieren die aufgetragenen Proteinmengen.

PdeB und PdeC reagieren als chromosomal und Plasmid-codierte Variante mit Proteolyse auf Reduktion mit 6,5 mM DTT (Abb. 13). Nach DTT Zugabe wird neben der 50 kDa Wildtyp Bande eine weitere bei ca. 30 kDa sichtbar. Diese Bande entspricht von der Größe der Abbau-Bande, einer PdeC^{ASS} Variante (Herbst & Hengge, 2018; Herbst et al., 2018) .

Plasmid-codiert ist die Proteininduktion von PdeD zu gering, um eine Redox-induzierten Proteolyse über DTT nachzuweisen. Der Nachweise konnte aber über die chromosomale Variante von PdeD erbracht werden (Abb. 13, PdeD, linke Spalte).

Die Redox-induzierte Proteolyse von PdeG konnte durch die schwache chromosomale Expression des Gens (siehe Abb. 9) nicht nachgewiesen werden. Der Effekt wird jedoch in der über Nacht Probe der Plasmid-codierten Variante von PdeG schwach sichtbar (undeutliche Bande in der Übernacht-Probe mit DTT).

Chromosomal-codiert nehmen die Proteinlevel von PdeN über Nacht deutlich ab, die Detektion der Redox-induzierten Proteolyse ist nicht möglich. Wird die Expression von *pdeN* (Plasmid-codiert) mit IPTG-induziert, werden die Proteinlevel durch die Überproduktion erhöht. In der über Nacht Probe mit DTT wird eine sehr schwache Bande bei 30 kDa sichtbar.

Wahrscheinlich ist nicht nur die Expression und Proteinstabilität bei der Detektion der Redox-induzierten Proteolyse von Bedeutung. Die CSS-Domänen-PDEs scheinen unterschiedlich auf die Reduktion mit DTT zu reagieren. Durch diese Beobachtung werden unterschiedliche Redox-Potentiale der DSBs der CSS-Domänen-PDEs für den Regulationsmechanismus ebenfalls in Betracht gezogen.

4.2.6 Induktion der CSS-Domänen-PDEs und die Beteiligung von DsbA und den Protease DegP und DegQ

Da das WT Protein in einer *dsbA* Mutante zu einem kleineren ca. 30 kDa großen Fragment prozessiert wird, stellt die reduzierte Form von PdeC ein Substrat für Proteasen dar. Als verantwortliche Protease wurden für PdeC bereits DegP und DegQ identifiziert, die vom DsbA/B System eingebrachte DSB schützt PdeC vor der Degradation durch ebendiese Proteasen (Herbst & Hengge, 2018; Herbst et al., 2018). Vergleichend sollte analysiert werden, ob alle CSS-Domänen-PDEs, wie PdeC, eine ähnliche Redox-abhängige Proteolyse zeigen.

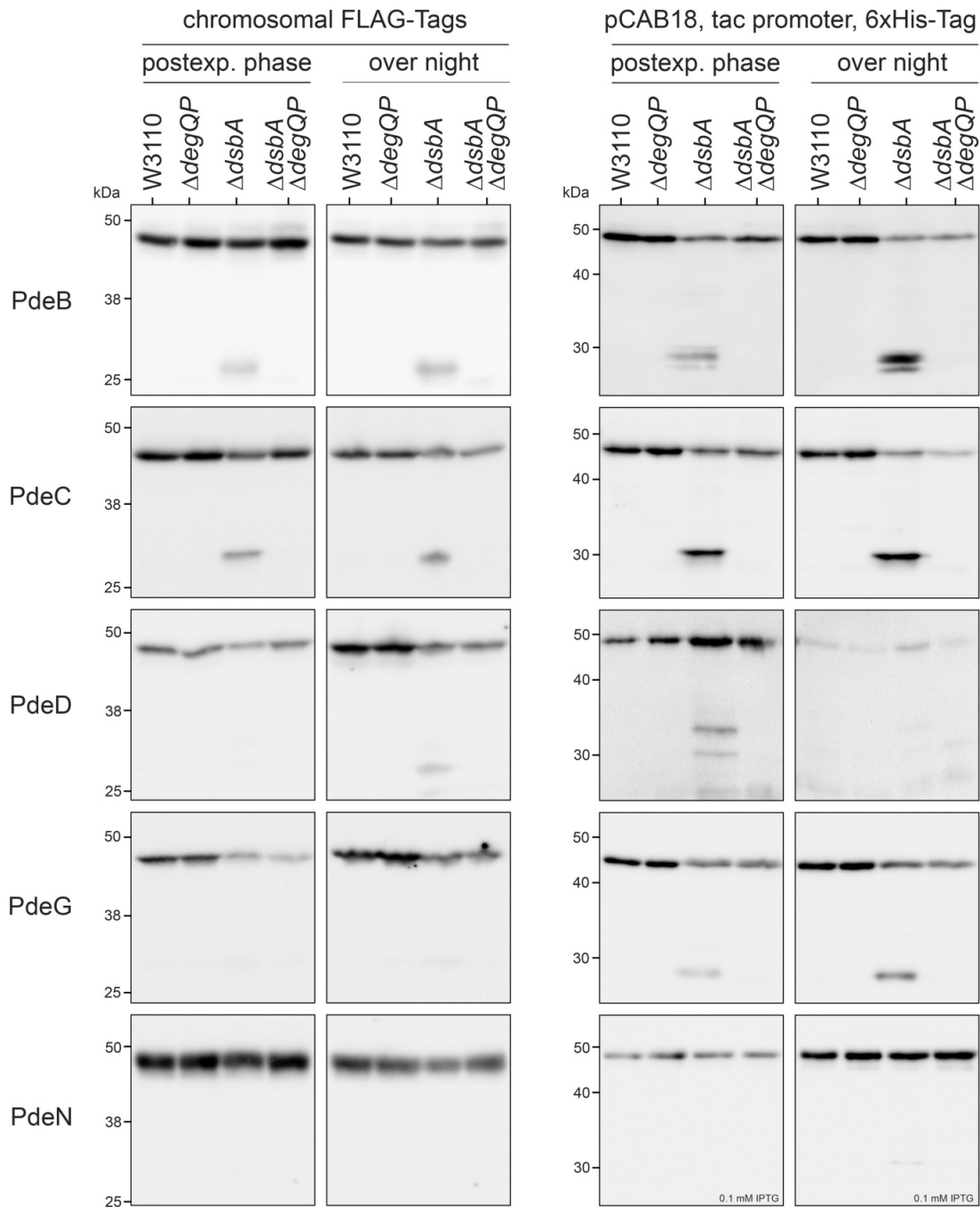


Abb. 14: Stabilisierung der CSS-Domänen-PDEs über DsbA und DegP/Q-abhängige Proteolyse

Die CSS-Domänen-PDE^{WT} Proteine mit C-terminalen 6-His-Tag wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in die Stämme *E. coli* K12 W3110, und entsprechende Mutanten $\Delta degP/Q$, $\Delta dsbA$, $\Delta dsbA \Delta degP/Q$ mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden bei 28 °C inkubiert, die Probenentnahme erfolgte während der post-exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ zwischen 2 – 3) und über Nacht. Zusätzlich wurden Kulturen der Stämme mit chromosomalen C-terminalen 3x FLAG-Tags angesetzt. Die Plasmid-codierten PdeN Proben wurden ab einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 0,1 mM IPTG induziert. Probenmengen FLAG-Tags: PdeB 12,5 µg; PdeC 25 µg; PdeD 30 µg; PdeG 35 µg; PdeN 20 µg, Probenmengen pCAB18: PdeB 12,5 µg; PdeC 20 µg; PdeD 60 µg; PdeG 12,5 µg; PdeN 7,5 µg. Die jeweiligen CSS-Domänen-PDE Varianten wurden anschließend durch Immunoblotting detektiert. Ein quantitativer Vergleich untereinander ist nicht möglich.

Für alle CSS-Domänen-PDEs konnte sowohl chromosomal als auch Plasmid-codiert gezeigt werden, dass das durch die *dsbA* Deletion entstehende 30 kDa Fragment der CSS-Domänen-PDE^{WT}-Varianten nur in Anwesenheit von DegP und DegQ detektierbar ist. Wird zusätzlich zu *dsbA* auch noch *degP* und *degQ* ausgeschaltet, ist das Fragment nicht mehr erkennbar. Bedingt durch geringe Proteinstabilität, konnte das Prinzip für PdeN nur Plasmid-codiert und induziert nur sehr schwach visualisiert werden (Abb. 14).

Inwieweit die DsbA-abhängige Proteolyse die Aktivität der CSS-Domänen-PDEs beeinflusst, sollte durch Makrokolonieexperimente bestätigt werden Abb. 15. Im Fall von PdeC besitzt das nicht prozessierte Protein und die proteolytisch prozessierte Variante PDE-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteolyse nicht essentiell für die Aktivität von PdeC ist, da ebenfalls eine PdeC^{ASS}-Variante in einer DegP/Q Mutante aktiv war (Herbst & Hengge, 2018; Herbst et al., 2018).

Analog zu Herbst et al. 2018, wurden die CSS-Domänen Plasmid-codiert in *E. coli* K12 AR3110 mit mutiertem *degP* und *degQ* in Makrokolonien analysiert und mit dem AR3110 WT verglichen. Über Änderungen im Aktivitätsmuster wurde überprüft, ob das Fehlen der Prozessierung von CSS-Domänen-PDE^{ASS}-Varianten Auswirkungen hat.

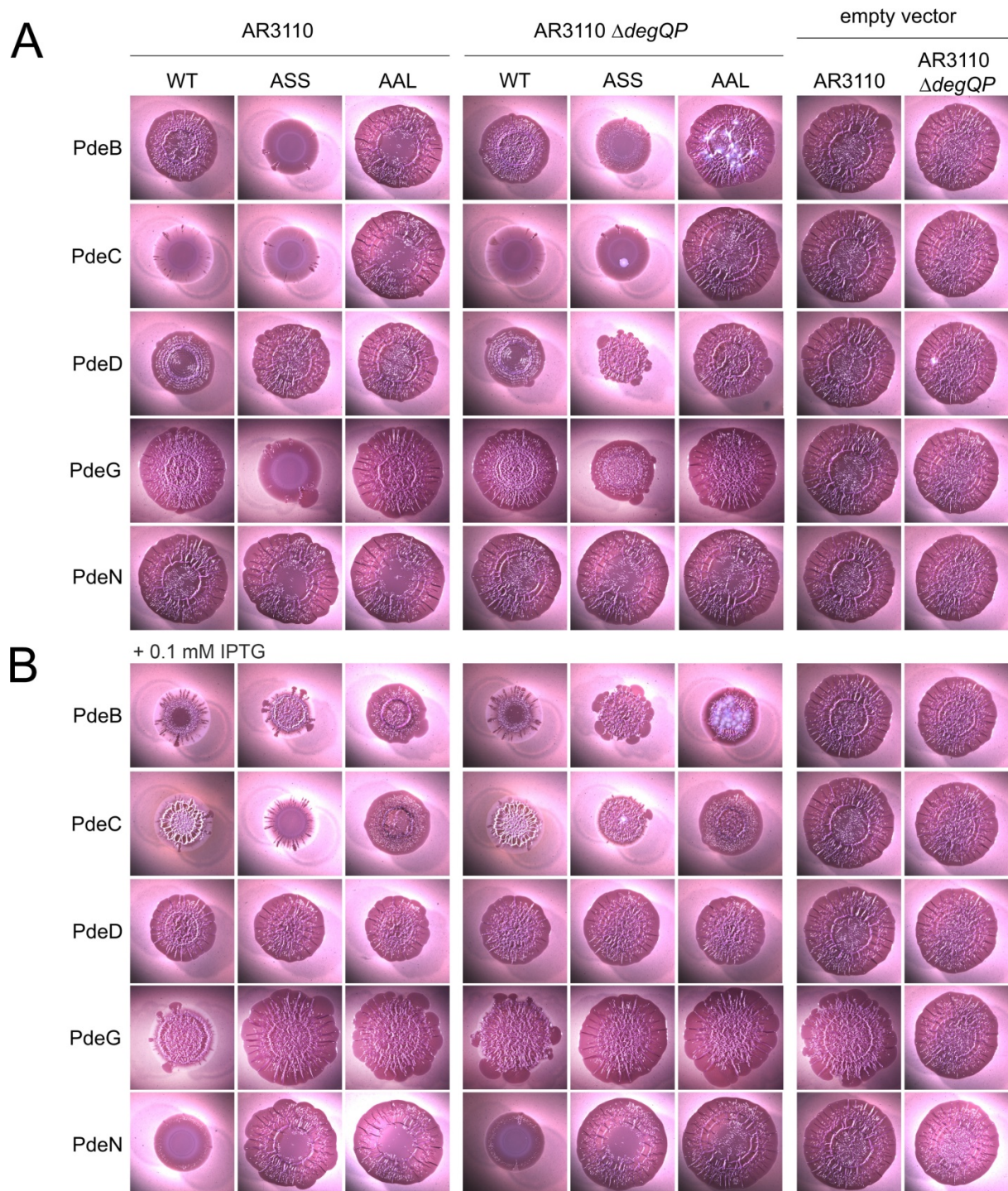


Abb. 15: Auswirkung der proteolytischen Prozessierung der CSS-Domänen-PDEs auf die Matrixproduktion

A) Die verschiedenen Varianten der CSS-Domänen-PDEs wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac*-Promoters kloniert und in *E. coli* K12 AR3110 und AR3110 $\Delta degP/Q$ mittels TSS übertragen. Die Makrokolonien wurden auf LB_{nos} unter Zugabe des Biofilmmatrixfarbstoffes Kongorot, 100µg/ml für fünf Tage bei 28 °C inkubiert. WT: Wildtyp CSS-Domänen-PDE; ASS: Cystein im CSS-Motiv durch ein Alanin ersetzt; AAL: Für PDE-Aktivität essentielle Aminosäure Glutaminsäure wurde durch ein Alanin ersetzt; empty vector: Leerplasmid ohne Insert. **(B)** Überproduktion der verschiedenen Varianten der CSS-Domänen-PDEs durch Induktion des *tac* Promotors mit 0,1 mM IPTG.

Für PdeB, PdeC und PdeG sind keine Veränderung des Aktivitätsmuster erkennbar. Die proteolytische Prozessierung durch DegP und DegQ scheint hier nicht für die Aktivität der CSS-Domänen-PDEs erforderlich zu sein. Sowohl die gänzliche Form als auch die prozessierte Variante können als aktive PDEs bezeichnet werden (

Abb. 14).

Im Vergleich der PdeD^{ASS}-Variante mit seiner WT-Form ist eine deutliche Zunahme der Matrixproduktion erkennbar, was auf eine verminderte PDE Aktivität von PdeD zurückzuführen ist. Somit scheint, wie bereits in Abb. 15 gezeigt, das Fehlen eines Cysteins in der PdeD^{ASS} Variante die PDE-Aktivität zu inhibieren. Im $\Delta degP/Q$ Hintergrund ist diese Inhibierung der Aktivität nicht mehr zu sehen (Vergleich mit PdeD^{AAL}). Die Makrokolonie besitzt deutlich mehr Struktur als der WT und ist deutlich kleiner. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die proteolytische Prozessierung durch DegP/Q bei PdeD auf die Aktivität des Proteins auswirkt.

Interessanterweise wird bei PdeN die bereits beobachtete Inaktivierung der PDE-Aktivität in der PdeN^{ASS}-Variante ebenfalls nicht über den proteolytische Abbau reguliert. Trotz der Deletion von *degP* und *degQ* erfolgt die Inaktivierung der PDE-Aktivität in der PdeN^{ASS} Variante.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass, obwohl alle CSS-Domänen-PDEs eine ähnliche Struktur, Redoxbiochemie und Proteolyse zeigen, sich die Folgen für die PDE-Aktivität maßgeblich unterscheiden können.

4.3 pH-abhängige Stabilisierung der CSS-Domänen-Phosphodiesterase PdeN

Redoxbiochemie und Proteolyse von PdeN unterscheiden sich nicht grundsätzlich von den anderen vier CSS-Domänen-PDEs. Allerdings ist PdeN die einzige CSS-Domänen-PDE, die nur sehr geringe Beeinflussung durch das DSB-System zeigt. Entweder ist die Affinität zu DsbA sehr gering und/oder PdeN besitzt durch die beiden hoch konservierten periplasmatischen Cysteine eine deutlich höhere oder geringere Stabilität als die anderen vier Varianten. Die Zugabe von DTT als Reduktionsmittel hat nur sehr geringe Auswirkung auf die Stabilität von PdeN. Auch die relativ hohe natürliche Expression, verbunden mit einem relativ geringen Protein-Level gibt einen weiteren Hinweis auf eventuelle auf noch unbekannte post-translationalen Regulationsmechanismen.

Das folgende Kapitel beschreibt einführende Experimente, die den Sachverhalt und die Methodik erläutern und genutzt werden, um die Regulation von PdeN weiter aufzuklären.

4.3.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Makrokolonieentwicklung und das Wachstum in Flüssigkulturen des Stammes *Escherichia coli* K12 AR3110

Zu Beginn dieses Kapitels wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Diese hatten das Ziel, die Einflüsse von verschiedenen Faktoren auf die Biofilmmatrixproduktion zu untersuchen. Unter anderem sollten potentielle pH-Effekte einiger Testsubstanzen ausgeschlossen werden. Der Einfluss des pH-Wertes wurde auf die Makrokolonieentwicklung und das Wachstum in Flüssigkulturen untersucht. Mittels einiger biologischer Puffersysteme wurde die Puffer-Kapazität in Kombination mit dem pH-Indikator Phenolrot untersucht (Abb. 16A, simulierter Verlauf des Farbumschlags sauren (gelb) zu alkalischen (rotviolett) von Phenolrot). So ließen sich pH-Wert-Änderungen des Wachstumsmediums während einer Inkubationszeit von sechs Tagen anhand der Farbveränderungen nachvollziehen.

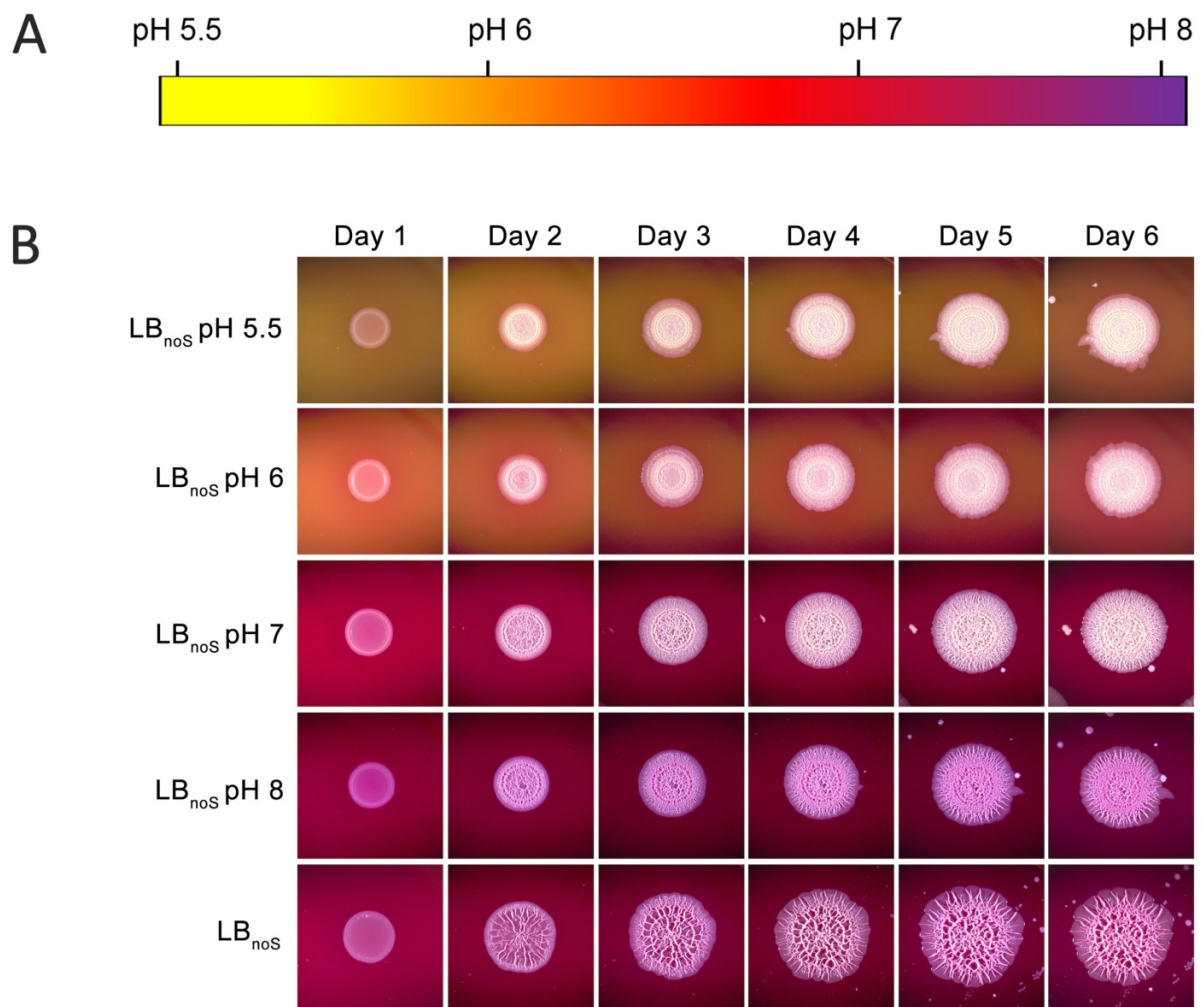


Abb. 16: Einfluss des pH-Wertes auf die Makrokolonieentwicklung des Stammes *E. coli* K12 AR3110

(A) Theoretischer Farbumschlag von Phenolrot von Gelb (pH 5,5) nach Rotviolett (pH 8) (B) Makrokolonien des Stammes AR3110 wurden auf salz-freiem LB Medium (LB_{nos}) unter Zugabe des pH Indikators Phenolrot (25 mg/l) und des entsprechenden Puffers (100 mM MES pH 5,5 und pH 6, 100 mM MOPS pH 7 und pH 8) für 6 Tage bei 28 °C inkubiert und das Wachstum täglich dokumentiert.

Die Pufferkapazitäten von 100 mM MES und 100 mM MOPS reichen aus, um den pH-Wert des Wachstumsmediums über den gesamten Inkubationszeitraum (6 Tage) konstant zu halten (Abb. 16B). Geringere Pufferstärken konnten dies nicht gewährleisten (Daten nicht gezeigt). Bereits am ersten Inkubationstag gleicht sich die Farbgebung der LB_{nos} Kolonien der Farbgebung des pH 8 Mediums an. Diese rasche Alkalisierung erfolgt über die Ausscheidung von überschüssigem Ammonium durch den Aminosäurekatabolismus der Zellen im Verlauf der Zeit (Sezonov et al., 2007).

Makrokolonien ohne Zugabe eines Puffers, sind etwas breiter und zeigen höhere Falten und breitere Stege als Makrokolonien auf gepufferten LB_{nos} Medium. Die Matrixproduktion scheint stärker zu sein. Wird der pH-Wert sukzessive abgesenkt, nimmt auch die Biofilmmatrixproduktion ab. Selbst bei pH 5,5 ist Biofilmmatrixproduktion nachweisbar. Mit entsprechenden Kontrollen eignet sich 100 mM MES pH 5,5 für weitere Analysen.

In Flüssigkulturen wurde der pH-Indikator Lackmus zur Analyse des pH-Wertes verwendet (Abb. 17). Nach bakteriellem Wachstum über Nacht wurde eine pH-Wertänderung des nicht gepufferten Mediums von ca. pH 7 auf ca. pH 8 beobachtet (Abb. 17, no buffer). Die Puffersysteme waren in der Lage den pH-Wert während der gesamten Inkubationszeit konstant zu halten. Das Wachstum der Zellen wurde parallel über die OD₅₇₈ verfolgt und zeigte für pH 7 und pH 8 keine Unterschiede zum LB-Medium. pH 9 zeigte kein Zellwachstum. Medien mit pH 5,5 oder pH 6 zeigten geringere Wachstumsraten verglichen mit LB-Medium (Daten nicht gezeigt). Um eine Vergleichbarkeit aller Proben zu gewährleisten sollte die Probenentnahme basierend auf der jeweiligen OD₅₇₈ erfolgen.

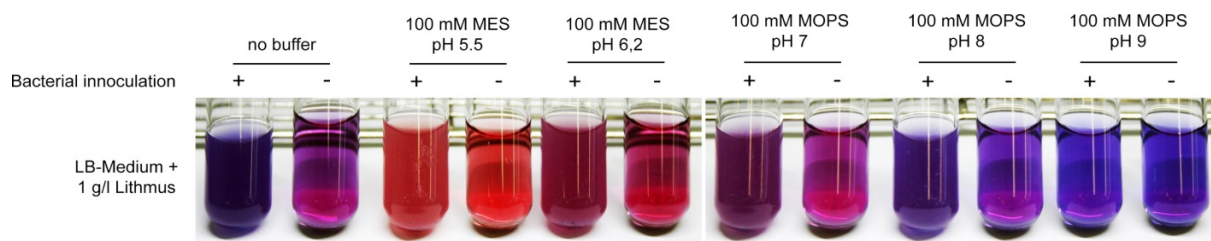


Abb. 17: Einfluss der Pufferstärke auf das Wachstum in Flüssigkulturen

LB-Medium wurde mit dem Universalindikator Lackmus (1 g/l) und den entsprechenden Puffern (100 mM MES pH 5,5, 100 mM MES pH 6, 100 mM MOPS pH 7 und 100 mM MOPS pH 8) versetzt und mit dem Stamm W3110 beimpft (+/-). Darauf wurden die Kulturen über Nacht bei 28 °C inkubiert.

4.3.2 Beteiligung der CSS-Phosphodiesterasen an der pH-abhängigen Veränderung der Matrixproduktion in *Escherichia coli* K12

Es wurde angenommen, dass die in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Veränderungen der Makrokoloniemorphologie bei Wachstum auf saurem oder alkalischem Medium mit der c-di-GMP-vermittelten Signaltransduktion in Verbindung stehen. Wie bereits ausführlich in Kapitel 1.6.2 beschrieben, kommen hier bei *E. coli* K12 12 DGCs, 13 PDEs und vier degenerierte Proteine in Frage (Hengge et al., 2015). Um deren Beteiligung an den Veränderungen der Morphologie der Makrokolonien zu untersuchen, wurden die Makrokolonien der chromosomalen Knockout-Mutanten der einzelnen DGCs und PDEs in Medien mit pH 8 (Abb. 18) und pH 5,5 (Abb. 19) verglichen. Bedingt durch die große Anzahl an zu vergleichenden Makrokolonien handelt es sich in Abb. 18 und Abb. 19 um 2 separate Experimente, wodurch auch eine separate Darstellung der Kontrollexperimente notwendig wird.

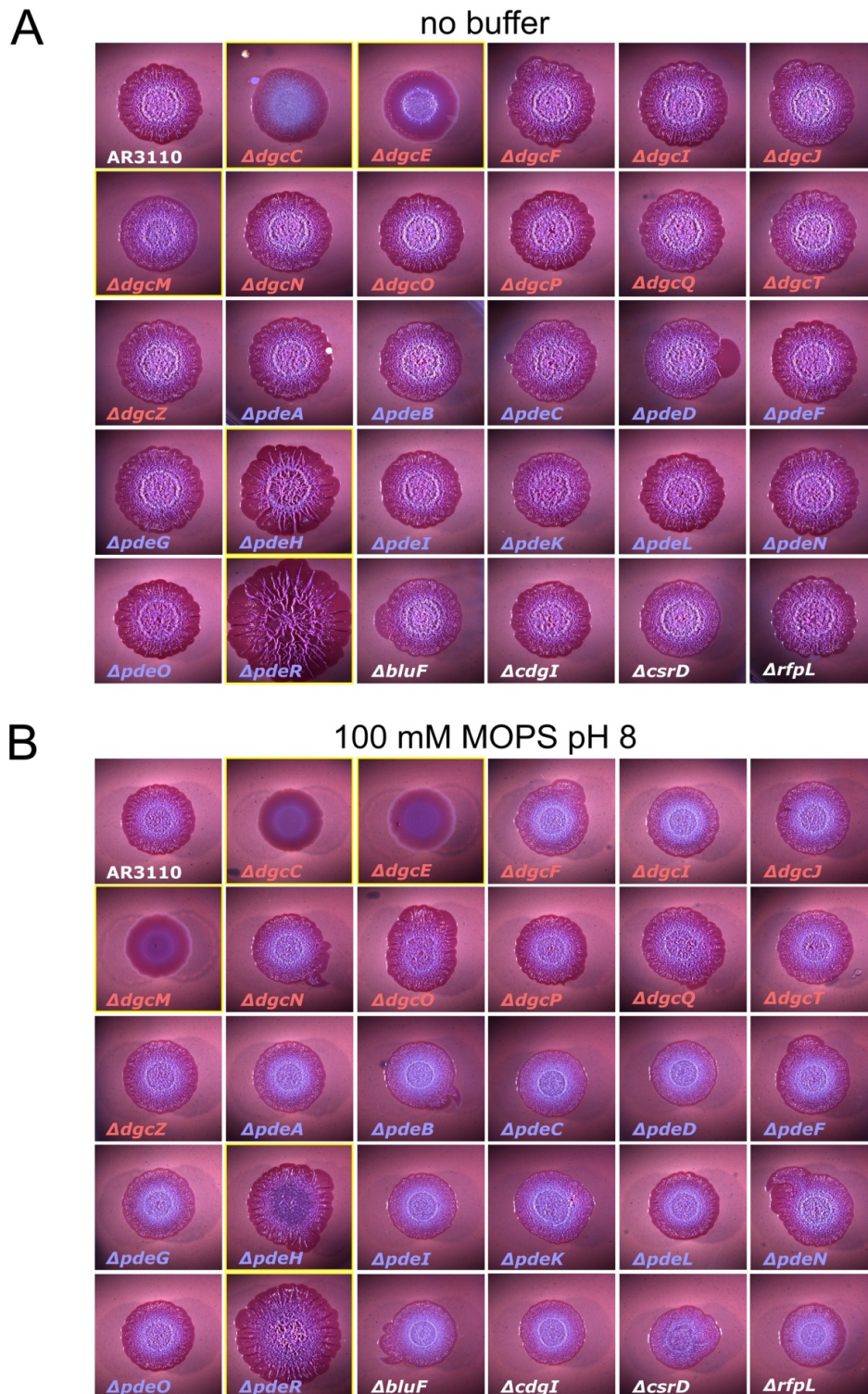


Abb. 18: Makrokolonien des Stammes AR3110 mit den entsprechenden Mutationen der Proteine mit GGDEF/EAL-Domäne bei pH 8

(A) Die Anzucht der Makrokolonien erfolgte wie bereits vielfach beschrieben (Kapitel 3.5.8). Die Mutationen der DGCs sind rot und die der PDEs sind blau hervorgehoben. Mutationen der Proteine mit degenerierten GGDEF/EAL-Domänen werden in weiß dargestellt. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28 °C auf LBnoS mit Kongorot. (B) Dem Wachstumsmedium wurde 100 mM MOPS pH 8 zugegeben. Gelber Rahmen: DGCs/PDEs mit signifikantem Phänotyp unter den beschriebenen Bedingungen

Die DGC- und PDE-Mutanten zeigten bei pH 8 im Vergleich zu nicht gepufferten LB_{noS} Medium keine eindeutigen Unterschiede zum Wild-Typ. Die Kolonien auf dem gepufferten Medium sind generell etwas kleiner und zeigen eine verminderte Matrixproduktion (Abb. 18). Chromosomale Knockout- Mutanten, wie *dgcC*, *dgcE*, *dgcM*, *pdeH* und *pdeR* zeigen deutliche Veränderungen der Makrokoloniemorphologie (Abb. 18, gelbe Rahmen). Diese Gene codieren für DGCs und PDEs, die maßgeblich an wichtigen Kontrollmodulen wie der *csgD* Transkription oder der CsgD-Aktivierung beteiligt sind (Lindenberg et al., 2013; Pesavento et al., 2008; Serra et al., 2013b). Sie scheinen aber keine Rolle bei pH-Wert Änderungen zu spielen.

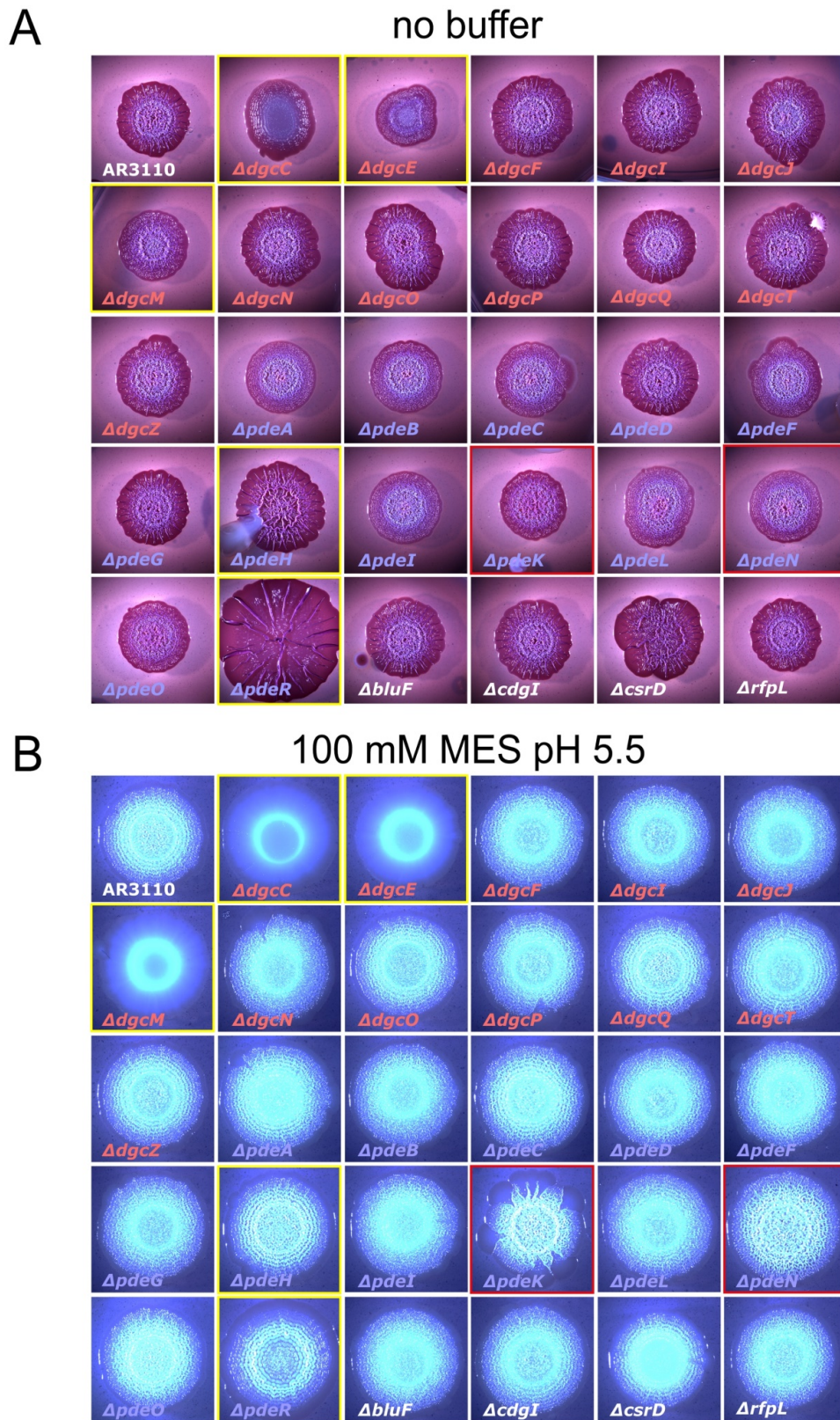


Abb. 19: Makrokolonien des Stammes AR3110 mit den entsprechenden Mutationen der Proteine mit GGDEF/EAL-Domäne bei pH 5,5

(A) Die Anzucht der Makrokolonien erfolgte wie bereits vielfach beschrieben (Kapitel 3.5.8). Die Mutationen der DGCs sind rot, die der PDEs blau hervorgehoben. Mutationen der Proteine mit degenerierten GGDEF/EAL-Domänen werden in weiß dargestellt. Die Inkubation erfolgte für fünf Tage bei 28 °C auf LB_{noS} mit Kongorot. (B) Dem Wachstumsmedium wurde 100 mM MES pH 5,5 zugegeben. Gelber Rahmen: DGCs/PDEs mit significantem Phänotyp unter den beschriebenen Bedingungen, roter Rahmen auffälliger Phänotyp bei Wachstum auf LB_{noS} pH 5,5

Die Kongorotlösung enthält zusätzlich Coomassie Brilliant Blue G250 und reagiert unter sauren Bedingungen bläulich und färbt das Medium und die äußeren Bereiche der Makrokolonien in der selben Farbe (Abb. 19B). Die Färbung der Biofilmmatrix verändert sich drastisch. Das Zentrum zeigt zunehmend hellere Farbtöne, die Falten und kleinen Stege erscheinen weißlich. Eine Charakterisierung der Biofilmstrukturen ist unter diesen Umständen schwierig, aber auch nicht nötig, da die Unterschiede in der Makrokoloniemorphologie auch ohne Farbstoff erkennbar sind. In den nachfolgenden Makrokolonieexperimenten wird deshalb im sauren Medium auf die Zugabe der Kongerotlösung verzichtet.

Der Vergleich des AR3110 WT Stamm mit der *pdeN* Knockout Mutante bei pH 5,5 zeigt eine deutliche Zunahme der Makrokoloniegröße und stärkere Ausbildung der Biofilmmatrix (Abb. 19, roter Rahmen). Die kleinen Falten und Stege erscheinen ausgeprägter und deuten auf PdeN als pH-induzierte PDE hin. Auch die *pdeK* Knockout Mutante scheint bei pH 5,5 ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Matrixproduktion zu bewirken. Auch andere Mutanten ($\Delta pdeR$, $\Delta pdeH$) zeigen diesen Phänotyp, sind aber im Vergleich zu *pdeN* und *pdeK* bei pH8 oder ohne Pufferzugabe unauffällig.

Die beiden PDEs PdeN und PdeK sind somit die einzigen Proteine, die eine veränderte Matrixproduktion bei Wachstum auf saurem Medium zeigen.

4.3.3 Expression von *pdeN* bei Wachstum auf saurem Medium

In einem ersten Schritt sollte geklärt werden, ob sich die Expression von *pdeN* während des Wachstums bei pH 5,5 verändert. Hierfür wurde die β -Galaktosidase Aktivität und Wachstumsrate von Mutanten mit *pdeN::lacZ* Fusion in den verschiedenen Wachstumsphasen in LB und LB pH 5,5 verglichen (Abb. 20).

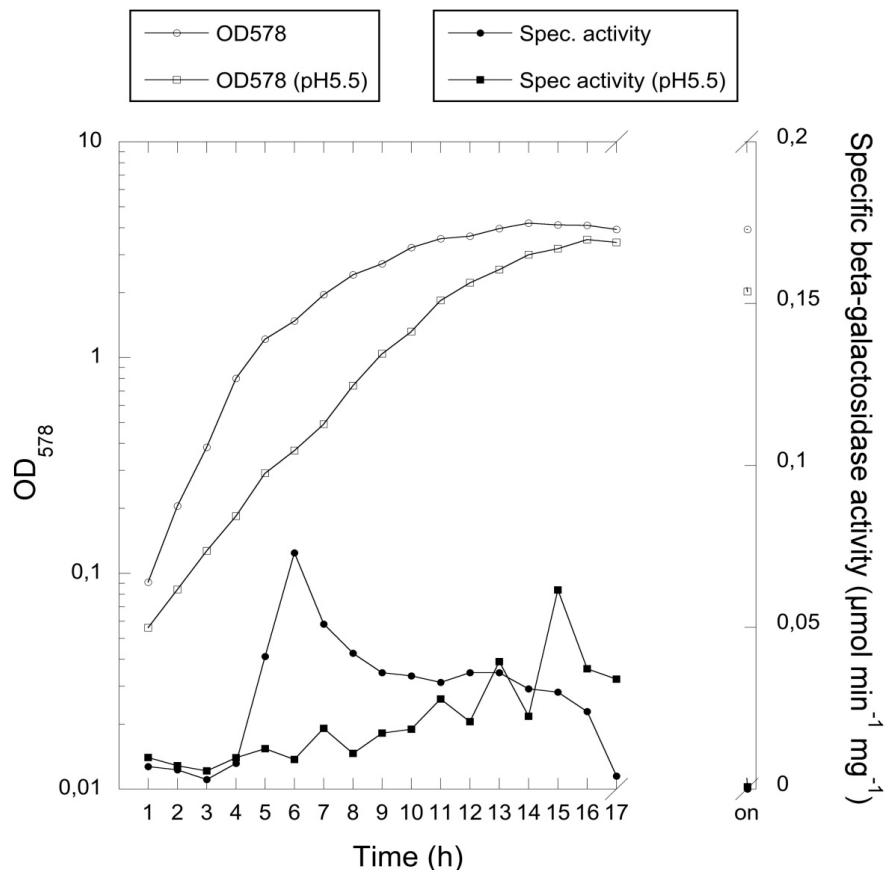


Abb. 20: Der pH-Effekt von *PdeN* wird nicht über die Transkription reguliert

Die Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität von *pdeN::lacZ* in den verschiedenen Wachstumsphasen erfolgte bei 28 °C in LB-Medium. Derivate des Stammes W3110 tragen eine einzelne Kopie einer *lacZ* Fusion im *pdeN* Gen. Die OD₅₇₈ (offene Symbole) und die spezifische β -Galaktosidase Aktivität (gefüllte Symbole) wurden entlang der Wachstumskurve und über Nacht (24 Std. nach Start des Experiments) bestimmt. Die Expression wurde jeweils in LB-Medium (Kreise) und in LB-Medium mit 100 mM MES pH 5,5 (Vierecke) verfolgt.

Im Vergleich zu LB-Medium wachsen die Kulturen in LB pH 5,5 deutlich, erreichen aber langsamer über Nacht eine vergleichbare OD₅₇₈ wie die LB-Kontrolle (siehe Kapiteln 4.3.1). Analog zu den Daten von Sommerfeldt et al. (2009) beginnt die Expression von *pdeN* in LB-Medium nach ca. 4 Std. bei einer OD₅₇₈ von ca. 0,2 und steigt dann steil an. Zwischen 6 und 9 Std. (OD 1-2) fällt diese recht schnell ab und sinkt in der post-exponentiellen Phase nach einer Plateauphase (9-13 Stunden) weiter ab. In den Übernachtproben konnte keine Expression von *pdeN* über die β -Galaktosidase Aktivität nachgewiesen werden. Dies überrascht aber auf Grund der RpoD-abhängigen Expression nicht (Sommerfeldt et al., 2009). Die β -Galaktosidase Aktivität für *pdeN::lacZ* bei pH 5,5 weicht deutlich von der des WT ab. Das Wachstum der Kulturen bei saurem pH ist deutlich verringert, die β -Galaktosidase Aktivität steigt langsamer an. Sie erreicht nach 15 Std. (post-exponentielle Phase) ein ähnlich hohes Maximum wie die Kontrolle, fällt dann langsam ab und ist über Nacht kaum noch nachweisbar. Das geringere Wachstum bei pH 5,5 verschiebt die Expression von *pdeN* lediglich nach hinten. Dadurch wird eine Veränderung der Expression von *pdeN* als Reaktion auf die sauren Wachstumsbedingungen unwahrscheinlich.

4.3.4 PdeN-Aktivität zeigt sich bei Wachstum bei pH 5,5

Agrund der Farbreaktion von Kongorot im LB_{noS} mit 100 mM MES pH 5,5 (vgl. Kapitel 4.3.2) wurde in dem nachfolgenden Experiment auf dessen Einsatz im Wachstumsmedium verzichtet, weshalb die Makrokolonien auf dem braun-gelblichen LB-Medium eher farblos erscheinen. Durch die Verwendung eines dunklen Kontrasts lassen sich die einzelnen Makrokolonien sehr gut ablichten. Die in Abb. 21 gezeigten Makrokolonien erscheinen auf dem schwarzen Medium gräulich mit bläulicher Einfärbung. Die 3-dimensionalen Strukturen der Matrix sind durch diese Belichtung auch ohne Farbstoff als weißliche Färbungen sehr gut zu erkennen.

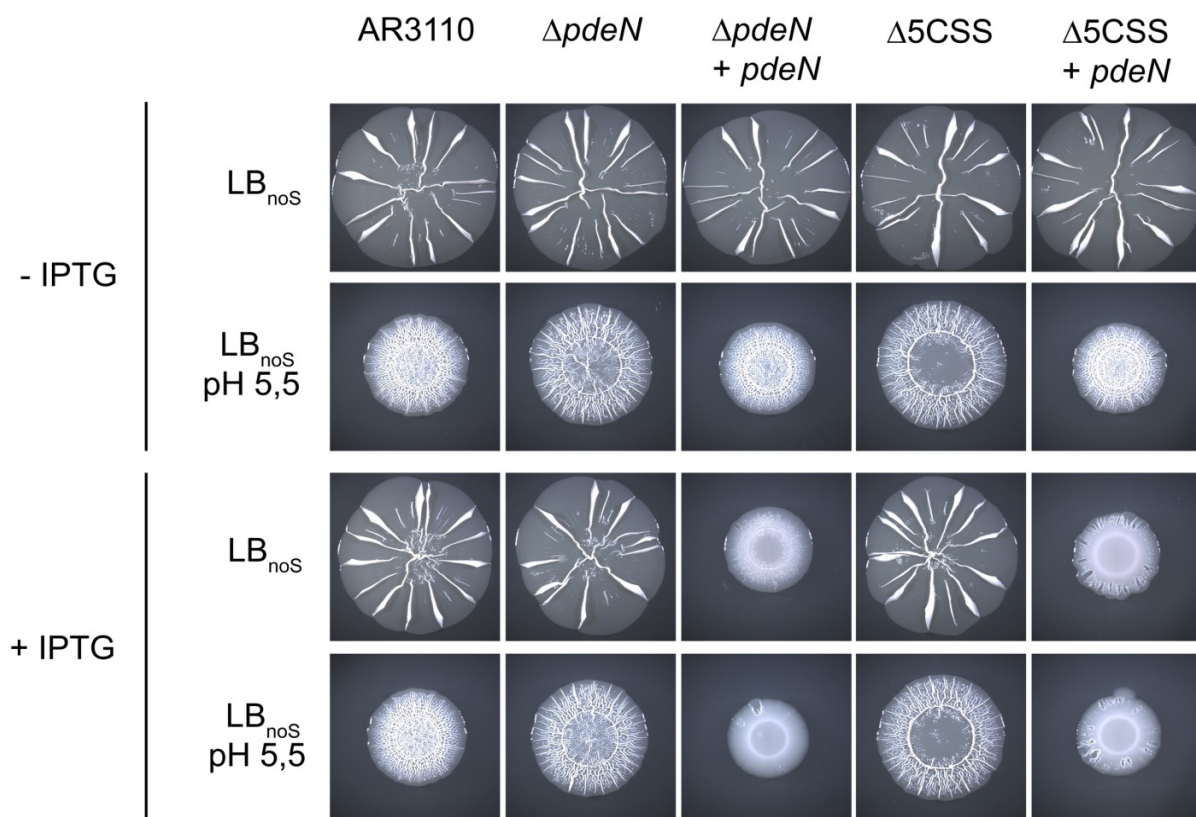


Abb. 21: PdeN wird durch das Wachstum bei pH 5,5 induziert

Das *pdeN* Gen wurde auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des tac Promoters kloniert und in *E. coli* K12 AR3110, AR3110 $\Delta pdeN$ und AR3110 $\Delta 5CSS$ mittels TSS übertragen. Die Makrokolonien wurden auf salz-freiem LB Medium unter Zugabe von 100 µg/ml AMP und, wenn angegeben, 100 mM MES pH 5,5 (LB_{noS} pH 5,5) für fünf Tage bei 28 °C inkubiert.

Die auf LB_{noS} Medium ohne IPTG gewachsenen Makrokolonien des WT und der Mutanten $\Delta pdeN$, $\Delta pdeN$ + *pdeN*, $\Delta 5CSS$ und $\Delta 5CSS$ + *pdeN* zeigen keine veränderte Makrokoloniemorphologie (Abb. 21, obere Reihe). Lediglich die fünffach Knockoutmutante aller CSS-Domänen-PDEs in *E. coli* K12 ($\Delta 5CSS$) erscheint etwas größer als der AR3110 WT-Stamm (Herbst & Hengge, 2018; Herbst et al., 2018). Die Makrokolonie der $\Delta pdeN$ Mutante

nimmt bei pH 5,5 deutlich an Größe zu und produziert mehr Matrix als der WT. Somit zeigt ohne IPTG Induktion und nicht-Vektor-codiert bereits Aktivität bei pH 5,5.

Wird diese Mutation durch *pdeN* (Vektor-codiert) komplementiert, gleicht die Makrokolonie dem WT Phänotyp. Sie erscheint jedoch etwas kleiner und weist eine geringere Matrixproduktion auf. Möglicherweise ist hier die Expression von *pdeN* über den *tac* Promoter stärker als im WT. Bei der $\Delta 5\text{CSS}$ -Variante nimmt die Makrokolonie nochmals an Größe zu, die Matrixproduktion übersteigt die der $\Delta pdeN$ Mutante.

Die Komplementierung der $\Delta 5\text{CSS}$ Mutante mit *pdeN* auf pCAB18 reduziert die Makrokoloniegröße und Matrixproduktion. Da der beobachtete Effekt generell in der $\Delta 5\text{CSS}$ -Mutante deutlich ausgeprägter ist, wird auch im Folgenden dieser Stammhintergrund verwendet. Eine AR3110-Kontrolle wurde aber trotzdem bei den Experimenten parallel getestet, um eventuelle experimentelle Abweichungen auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

Durch die Zugabe von IPTG im Wachstumsmedium wird die Expression von *pdeN* über den *tac* Promoter induziert. Die Makrokolonien, in denen eine Komplementierung mit *pdeN* auf pCAB18 erfolgte, zeigen eine stark verminderte Matrixproduktion bedingt durch die erhöhte PDE-Aktivität von PdeN (Abb. 21, untere Reihe). Bei pH 5.5 weisen die Mutanten $\Delta pdeN$ und $\Delta 5\text{CSS}$ keinen Unterschied zu den nicht-induzierten Makrokolonien auf. Erst durch die Komplementierung mit *pdeN* auf pCAB18 wird eine deutliche Verringerung der Matrixproduktion erreicht, welche stärker als ohne IPTG Zugabe ausfällt.

Generell ist eine Beteiligung der anderen vier CSS-Domänen-PDEs neben PdeN an der pH-abhängigen Induktion der PDE-Aktivität nicht ausgeschlossen. Jedoch scheint PdeN hier den größten Teil dieses Effekts auszumachen. Festzuhalten bleibt, dass PdeN eine erhöhte Aktivität bei pH 5,5 besitzt und diese sowohl induziert als auch nicht-induziert gezeigt werden konnte.

4.3.5 Die pH-abhängige Aktivierung von PdeN erfolgt auch bei einer Reduktion der konservierten Cysteine der CSS-Domäne

Um die Beteiligung der konservierten Cysteine in der CSS-Domäne von PdeN an der pH-abhängigen Induktion der PDE-Aktivität von PdeN zu untersuchen, wurde die Makrokoloniebildung verschiedener PdeN Varianten (PdeN^{WT}, PdeN^{C76A}, PdeN^{ASS}, PdeN^{AVL}) auf LB pH 5,5 analysiert.

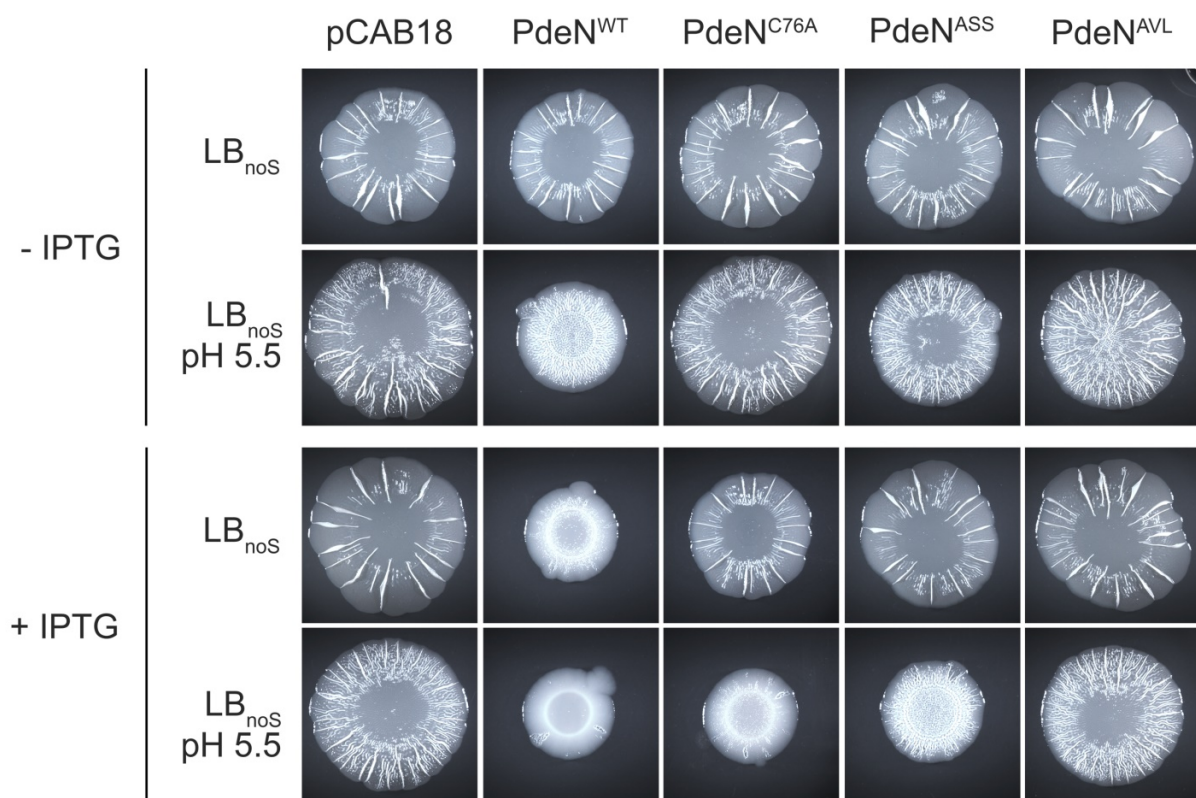


Abb. 22: Die pH-abhängige Aktivierung von PdeN erfolgt auch bei einer Reduktion der konservierten Cysteine der CSS-Domäne

Das *pdeN*-Gen und die beschriebenen Varianten wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in *E. coli* K12 AR3110 Δ 5CSS mittels TSS übertragen. Die Makrokolonien wurden auf salz-freiem LB Medium unter Zugabe von 100 μ g/ml AMP, wenn angegeben, mit 100 mM MES pH 5,5 (LB_{noS} pH 5.5) versetzt, ohne bzw. mit 0,1 mM IPTG (- IPTG / + IPTG) induziert und für fünf Tage bei 28 °C inkubiert.

Die PDE-Aktivität von PdeN^{WT} ist bei einem Wachstum auf LB_{noS} nur mit Zugabe von 0,1 mM IPTG in den Makrokolonien zu zeigen (Abb. 22, Vergleich auch mit Abb. 10). Betrachtet man die Makrokolonien beider Varianten, in denen jeweils eines der konservierten Cysteine in der CSS-Domäne von PdeN durch ein Alanin ausgetauscht wurde (PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS}), verändert sich die Morphologie der Makrokolonien bei LB_{noS} pH 5,5 nicht. Erst nach Induktion der Expression mit IPTG ist eine pH-abhängige Aktivierung von PdeN über die Reduktion der Matrixproduktion sichtbar. Trotz PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS} Mutation der konservierten Cysteine ist eine Aktivierung von PdeN über die Reduktion der Biofilmmatrixproduktion ersichtlich. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch die Expression von *csgB* absenkt, wurde diese analog zu Abb. 23 untersucht.

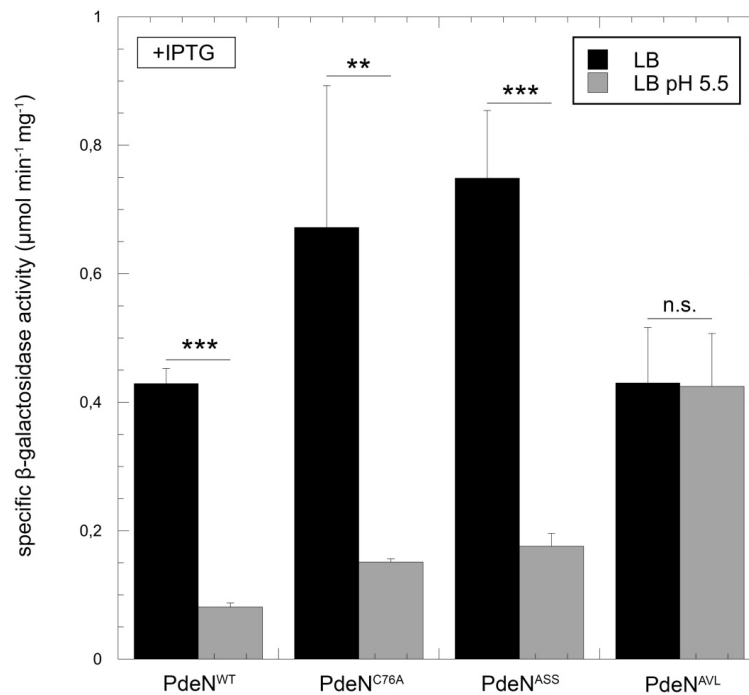


Abb. 23: Die pH-abhängige Aktivierung von PdeN senkt die Expression von *csgB* drastisch ab

Die Messung der Expression von *csgB::lacZ* erfolgte bei 28 °C. Der Stamm GB1100 trägt eine einzelne Kopie einer *lacZ*-Fusion im *csgB* Gen. PdeN und seine Varianten wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den besagten Stamm mittels TSS übertragen. Die spezifische β -Galaktosidase Aktivität wurde 24 Std. nach Start des Experiments bestimmt. Die Expression wurde jeweils in LB-Medium und LB 100 mM MES pH 5,5 (LB pH 5,5), jeweils mit 100 μ g/ml AMP und 0,1 mM IPTG, verfolgt. Jedes Experiment wurde mit einer Leerplasmidkontrolle durchgeführt. Diese entsprach der gezeigten PdeN^{AVL} Negativkontrolle. Für die Quantifizierung wurden 3 unabhängige Experimente ausgewertet. *, ** und *** repräsentieren P-Werte von < 0,1, < 0,01 und < 0,001 berechnet mit einem unabhängigen T-Test der LB pH 5,5 Werte in Bezug zur LB Kontrolle.

Die pH-abhängige Aktivierung von PdeN bei Wachstum auf LB pH 5,5 senkt die Expression von *csgB* nach Induktion des *tac* Promoters des pCAB18 Plasmids mit 0,1 mM IPTG im WT und den Varianten drastisch ab (Abb. 23). Dies bestätigt Beobachtungen aus Makrokoloniexperimenten, in denen die verringerte Expression von *csgB* zu deutlich weniger Biofilmmatrix Produktion führt (Ishihama, 2000; Römling et al., 2000; Weber et al., 2006). Ersichtlich wird dies durch den Verlust der charakteristischen Morphologie, angezeigt durch die Leerplasmidkontrolle in Abb. 22. Sowohl PdeN^{WT} als auch PdeN^{AVL} exprimieren in LB Medium gleiche *csgB* Mengen, die auch zu einer vergleichbaren, wildtypisch hohen Matrixproduktion in Makrokoloniexperimenten führt (Abb. 22). Wachsen die beiden Versionen jedoch auf LB pH 5,5, führt die erhöhte PDE Aktivität des PdeN^{WT} zu einer deutlich verringerten Expression von *csgB*. Die katalytisch inaktive PdeN^{AVL}-Variante ist nicht in der Lage, die Expression von *csgB* über die PDE Aktivität zu beeinflussen. Somit konnte gezeigt werden, dass die pH-abhängige Aktivierung von PdeN über die verringerte c-di-GMP-abhängige *csgB*-Expression erfolgt.

4.3.6 PdeN wird in Abhängigkeit des pH-Wertes induziert

Kapitel 4.3.3 hat gezeigt, dass PdeN bei pH 5,5 nicht über eine veränderte Expression des *pdeN*-Gens reguliert wird. Deshalb sollten mit Hilfe von chromosomalen und C-terminalen 3xFLAG-Tag-Varianten von PdeN die Proteinmengen bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt werden.

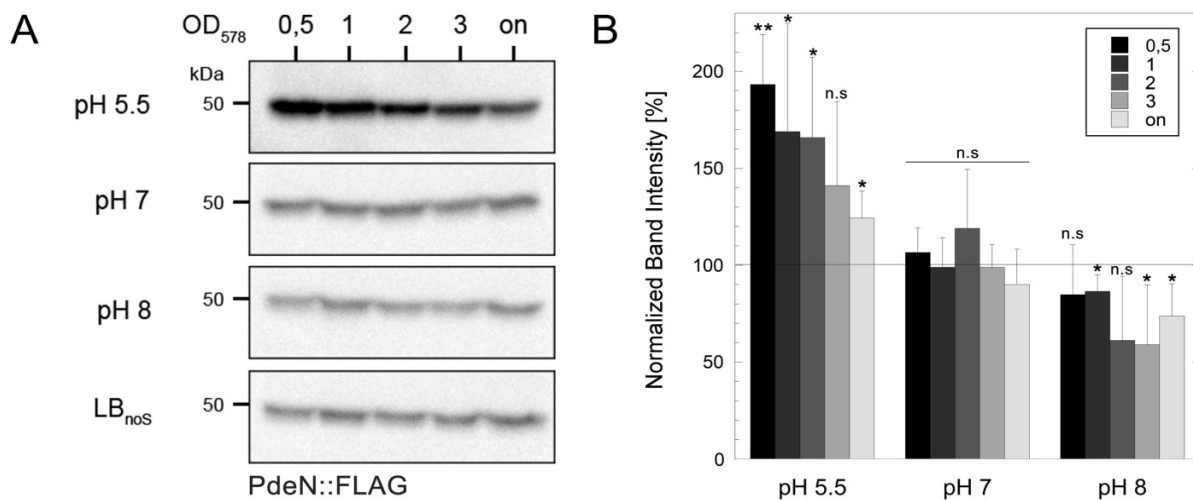


Abb. 24: PdeN^{WT} wird pH-abhängig induziert

(A) Kulturen von chromosomalen und C-terminal 3xFLAG getaggttem PdeN^{WT} wurden bei 28 °C inkubiert und, wenn angezeigt, mit 100 mM MES pH 5.5 (pH 5,5), 100 mM MOPS pH 7 (pH 7), 100 mM MOPS pH 8 (pH 8) versetzt. Die Probenentnahme erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0,5; 1; 2; 3 und über Nacht. Von allen Proben wurden 30 µg aufgetragen. PdeN wurde anschließend durch Immunoblotting detektiert. (B) Für die Quantifizierung wurden 3 unabhängige Experimente ausgewertet. Hierfür wurden mittels ImageQuant die PdeN^{WT} Bandenintensitäten quantifiziert und über die PdeN^{WT} Banden ohne Zugabe eines der angezeigten Puffer (LB_{nos}) bei der entsprechenden OD₅₇₈ normalisiert (Horizontale Linie bei 100 %). * und ** repräsentieren P-Werte von < 0.1 und < 0.01, berechnet mit einem unabhängigen T-Test in Bezug zur LB_{nos} Kontrolle. Die hier dargestellten Banden wurden jeweils auf einem Blot generiert und sind untereinander vergleichbar.

Die PdeN-Banden bei ca. 50 kDa sind bei pH 5,5 deutlich intensiver als für pH 7, pH 8 und in LB_{nos} beobachtet. In der exponentiellen Wachstumsphase (OD₅₇₈ = 0,5) wird bei pH 5,5 die größte Proteinmenge detektiert. Diese nimmt im zeitlichen Verlauf stetig ab (Abb. 24A und B). Für die anderen Bedingung bleiben die Bandenintensitäten fast konstant. Bedingt durch die RpoD-Abhängigkeit von PdeN ist davon auszugehen, dass ab der post-exponentiellen Phase keine Expression des Gens mehr erfolgt (Sommerfeldt et al., 2009). Die konstant bleibende Bandenintensität weist auf post-translationale Induktion von PdeN hin, die durch Säure induziert wird.

4.3.7 Wachstum bei pH 5.5 induziert alle PdeN-Varianten

Kapitel 4.3.6 zeigt, dass die periplasmatischen, hoch konservierten Cysteine verantwortlich sind für die Stabilität der CSS-Domänen-PDEs. Vergleichbar zur Redox-regulierten Proteolyse von PdeC (Herbst et al. 2018) könnte sich eine Veränderung des pH-Wertes auch auf den

Redoxzustand der konservierten Cysteine im Periplasma auswirken und die Stabilität von PdeN bei pH 5,5 erhöhen.

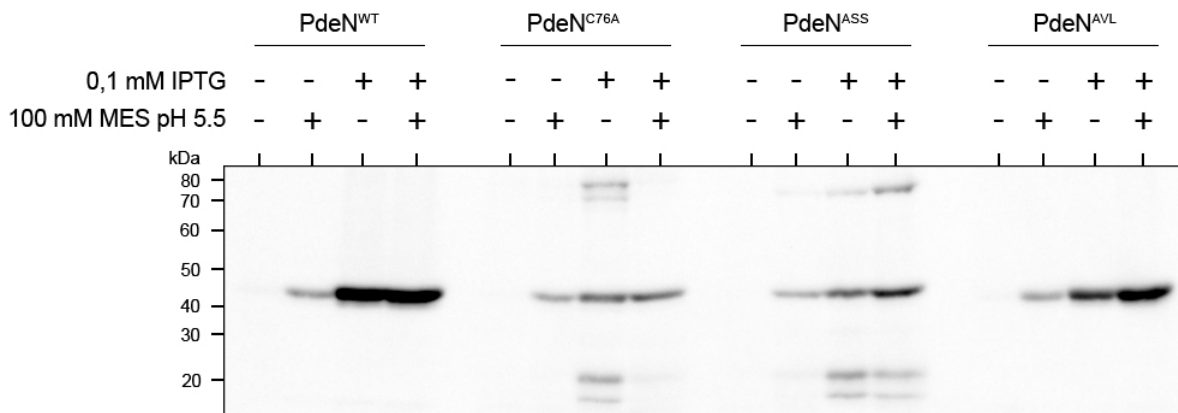


Abb. 25: Wachstum bei pH 5.5 stabilisiert die PdeN^{WT} Version

PdeN und seine Varianten mit C-terminalen 6-His-Tag wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den Stamm *E. coli* K12 W3110 mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden bei 28 °C inkubiert und die Probenentnahme erfolgte über Nacht. Wenn angezeigt, wurden die Kulturen ab einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 0,1 mM IPTG induziert und 100 mM MES pH 5.5 zugegeben. Von allen Proben wurden 30 µg aufgetragen. Die jeweiligen PdeN Varianten wurden anschließend durch Immunoblotting detektiert. Die hier dargestellten Banden wurden jeweils auf einem Blot generiert und sind untereinander vergleichbar.

In LB_{noS} ohne IPTG Induktion ist PdeN^{WT}, PdeN^{C76A}, PdeN^{ASS} und PdeN^{AVL} kaum nachweisbar (Abb. 25). Die Expression über den *tac* Promoter erzeugt folglich geringere Proteinlevel als die Expression über chromosomale FLAG-Tags. Durch das Wachstum bei pH 5,5 wird die gänzliche Form von PdeN (50 kDa Bande) induziert (deutliche Zunahme bei PdeN^{WT}, PdeN^{C76A}, PdeN^{ASS} und PdeN^{AVL}; geringe Zunahme der 30 kDa Abbaubande). Bedingt durch IPTG-Induktion ist die PdeN-Bande (50 kDa) und die Abbaubande (30 kDa) in den Varianten PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS} (+IPTG) deutlich nachweisbar. Verglichen mit Wachstum bei pH 5,5 nimmt jedoch der Abbau von PdeN (30 kDa Bande) im Vergleich zum LB-Medium ab (PdeN^{C76A} deutlich, PdeN^{ASS} geringer). Es wäre möglich, dass der DegP/Q-vermittelte Abbau, wie von Herbst et al. (2018) für PdeC beschrieben, bei PdeN durch das saure Milieu beeinflusst wird. Unterstützend wirkt hier, dass in Makrokolonien die pH-abhängige Induktion der PDE-Aktivität von PdeN auch in den PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS} erfolgt (Abb. 22). Es ist also wahrscheinlich, dass die gänzliche Form von PdeN (50 kDa Bande) die aktive Variante ist, dessen Abbau über DegP/Q bei saurem pH minimiert werden könnte. Das Phänomen der Zunahme der gänzlichen Form von PdeN bei Wachstum unter sauren Bedingungen wird nachfolgend als pH-abhängige Induktion bezeichnet.

4.3.8 Die pH-abhängige Induktion von PdeN ist spezifisch für das Wachstum bei einem sauren pH

Um die Säure-Spezifität der pH-abhängigen Induktion von PdeN zu klären, wurden PdeN Proteinlevel inkl. seiner Varianten bei verschiedenen pH-Werten (pH 5,5; pH 6; pH 7; pH 8 in LB) über Nacht Kulturen mittels Western-Blot analysiert und die Induktion von PdeN verfolgt.

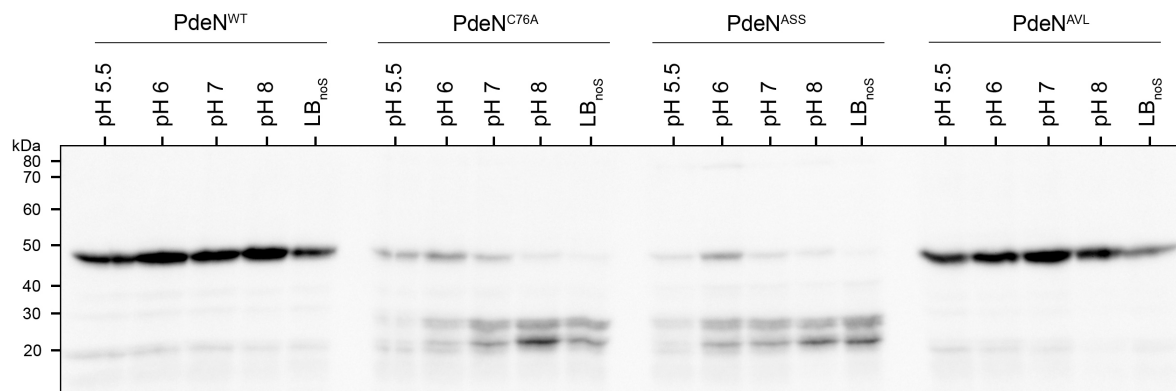


Abb. 26: Die pH-abhängige Induktion von PdeN ist spezifisch für das Wachstum bei einem sauren pH

PdeN und seine Varianten mit C-terminalen 6-His-Tag wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den Stamm *E. coli* K12 W3110 mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden bei 28 °C inkubiert und die Probenentnahme erfolgte über Nacht. Die Kulturen wurden ab einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 0,1 mM IPTG induziert und, wenn angezeigt, mit 100 mM MES pH 5.5 (pH 5,5), 100 mM MES pH 6 (pH 6), 100 mM MOPS pH 7 (pH 7), 100 mM MOPS pH 8 (pH 8) versetzt. Von allen Proben wurden 30 µg aufgetragen. Die jeweiligen PdeN Varianten wurden anschließend durch Immunoblotting detektiert. Die hier dargestellten Banden wurden jeweils auf einem Blot generiert und sind untereinander vergleichbar.

Die pH-abhängige Induktion von PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS} ist spezifisch für das Wachstum bei einem sauren pH-Wert. Sie wird vor allem durch die Abnahme der Menge der 50 kDa Bande bestätigt (Abb. 26). Die Proteolyse von PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS}, sichtbar als Abbaubanden bei 30 kDa, ist das Ergebnis der Aktivität der beiden periplasmatischen Proteasen DegP und DegQ (Kapitel 4.2.6). Durch die deutlich geringeren Bandenintensitäten der 30 kDa Abbaubande bei pH 5,5 im Vergleich zu höheren pH-Werten ist wahrscheinlich eine Veränderung der Protease Aktivität von DegP und DegQ für die pH-abhängige Induktion von PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS} verantwortlich.

4.3.9 Die Proteasen DegP und DegQ sind nicht essentiell für die pH-abhängige Induktion von PdeN

Ob DegP und DegQ ursächlich an der pH-abhängigen Induktion von PdeN beteiligt sind, wird durch ein Quantifizierungsexperiment geklärt. Die Stabilität von PdeN im Wildtyp Stamm W3110 soll vergleichend zu einer $\Delta degP/Q$ Variante in LB und LB pH 5,5 untersucht werden.

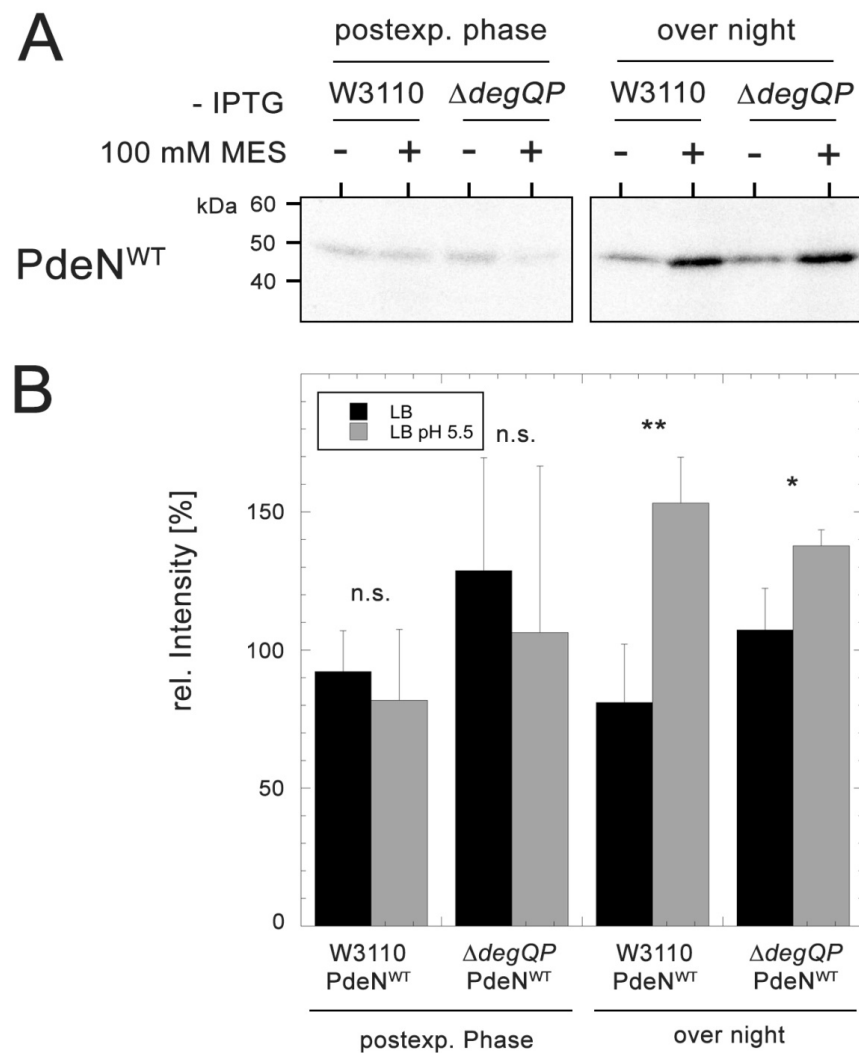


Abb. 27: DegP und DegQ sind nicht allein für die pH-abhängige Induktion von PdeN verantwortlich

(A) PdeN mit C-terminalen 6-His-Tag wurde auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den Stamm *E. coli* K12 W3110 und $\Delta degP/Q$ mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden mit 100 μ g/ml AMP versetzt, bei 28 °C inkubiert, die Probenentnahme erfolgte in der post-exponentiellen Phase (OD_{578} 2 bis 3) und über Nacht. Wenn angezeigt, wurde ab einer OD_{578} von 0,5 100 mM MES pH 5,5 den Kulturen zugegeben. Von allen Proben wurden 45 μ g aufgetragen. Die gezeigten Banden wurden auf einem Blot detektiert und sind untereinander vergleichbar. (B) Für die Quantifizierung wurden 3 unabhängige Experimente ausgewertet. Hierfür wurden mittels ImageQuant die PdeN^{WT} Bandenintensitäten quantifiziert und über die PdeN^{WT}-Banden in der post-exponentiellen Phase und über Nacht normalisiert. n.s. kennzeichnet nicht signifikante Werte, * und ** repräsentieren P-Werte von < 0.1 und < 0.01 berechnet mit einem unabhängigen T-Test.

In der post-exponentiellen Phase ist die pH-abhängige Induktion von PdeN nicht detektierbar (Abb. 27). Über Nacht Kulturen zeigen jedoch trotz des Fehlens von DegP und DegQ eine Induktion von PdeN bei pH 5,5 über signifikant erhöhte PdeN Konzentration. Eine Beteiligung von DegP und DegQ an der pH-abhängigen Induktion kann nicht ganz ausgeschlossen werden. Die PdeN^{WT} Konzentrationen im *degP/Q* Hintergrund sind im Vergleich zum W3110 Stamm Hintergrund deutlich erhöht. Somit scheinen DegP und DegQ, unabhängig vom pH die PdeN^{WT} Konzentration zu erhöhen. Folglich sind DegP und DegQ nicht maßgeblich an der pH-abhängigen Induktion beteiligt.

4.3.10 Der N-Terminus von PdeN ist essentiell für die zelluläre Konzentration des Gesamtproteins

Eine weitere Möglichkeit, die pH-abhängige Induktion von PdeN auch in Abwesenheit der Proteasen DegP und DegQ zu erklären, ist eine Beteiligung des N-Terminus von PdeN. Wie in Abb. 8 gezeigt, ist PdeN die einzige CSS-Domänen-PDE mit einem Phenylalanin an Position 2 nach dem Methionin. Nach der 'N-End-Rule' könnte diese Aminosäure PdeN destabilisieren, da es einen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit des Proteins nach der abgeschlossenen Proteinbiosynthese haben kann (Sommerfeldt et al., 2009) und sich die Halbwertszeit eines Proteins von über 10h auf bis zu 2 Minuten reduzieren kann (Varshavsky, 1997). Somit ist eine Auswirkung von F2 von PdeN auf die Funktion sowie Aktivität oder Regulation ist sehr wahrscheinlich. Um zu prüfen, ob diese Regel wirklich für PdeN gilt, wurden PdeN Varianten mit modifizierten N-Termini (PdeN^{F2S}, PdeN^{F2S/I3G} und PdeN^{C-NT}) konstruiert (Abb. 28A) und die Proteinkonzentrationen verglichen.

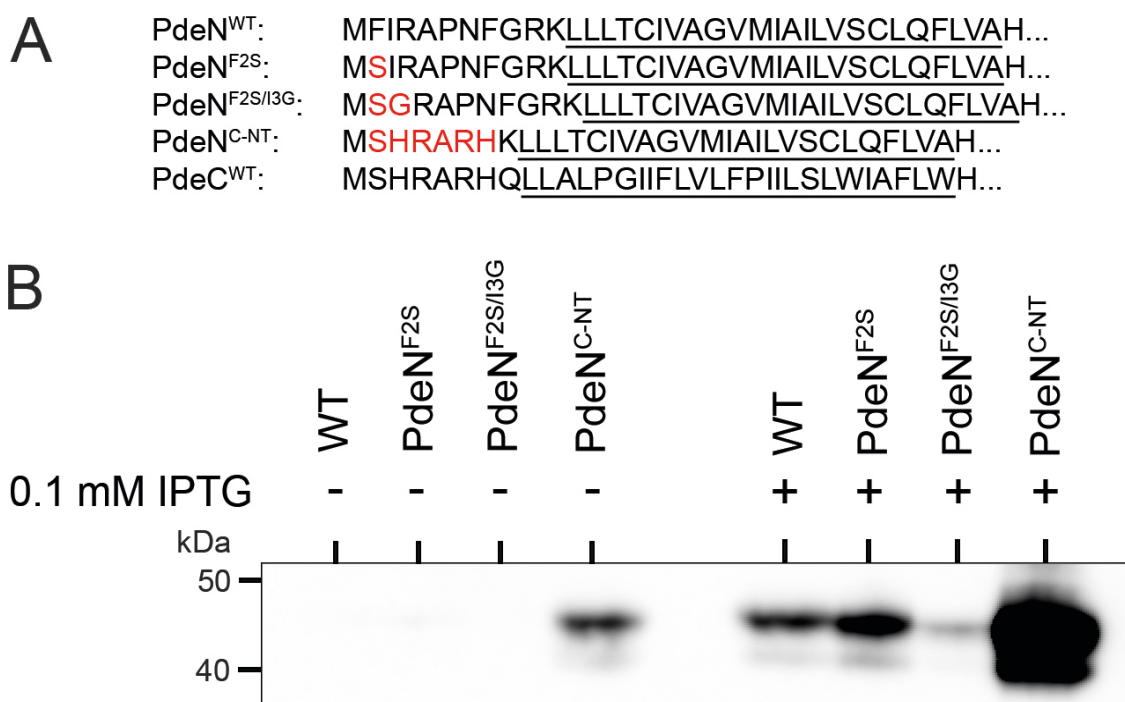


Abb. 28: Der N-Terminus ist essentiell für die Stabilität von PdeN

(A) Übersicht der PdeN-Varianten mit veränderten N-Termini. Rot markierte Buchstaben zeigen die veränderten Aminosäuren und die unterstrichenen Bereiche die TM1-Domäne der entsprechenden Proteine an. **(B)** PdeN und die Varianten PdeN^{F2S}, PdeN^{F2S/I3G}, PdeN^{C-NT} mit C-terminalen 6-His-Tag, wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den Stamm *E. coli* K12 W3110 mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden bei 28 °C inkubiert, die Probenentnahme erfolgte über Nacht. Wenn angezeigt wurden die Kulturen ab einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 0,1 mM IPTG induziert. Von allen Proben wurden 25 µg aufgetragen. Die jeweiligen PdeN Varianten wurden anschließend durch Immunoblotting detektiert.

Der Aminosäureaustausch des F2S zeigt im Western-Blot keine erhöhte zelluläre Konzentration von PdeN gegenüber dem WT (Abb. 28). Laut *N-End-Rule* sollte Glycin keinen Einfluss auf die Halbwertszeit eines Proteins haben (Varshavsky, 1997). In einer weiteren

Mutante wurde zusätzlich zum F2S ein I3G Austausch vorgenommen (PdeN^{F2S/I3G}, Abb. 28A). Anders als erwartet, erhöht sich auch mit diesem N-Terminus die Proteinstabilität nicht. Die Proteinmenge verringert sich bei Zugabe des Induktors IPTG (Abb. 28, rechtes Panel). PdeC gilt als relativ leicht zu detektierende CSS-Domänen-PDE (Herbst et al., 2018). In einem weiteren Versuch wurde deshalb der gesamte N-Terminus von PdeN durch den N-Terminus von PdeC ausgetauscht (PdeN^{C-NT}). Die Analyse der Protein Menge dieser PdeN^{C-NT} Variante zeigte im Western-Blot einen deutlichen Anstieg der zellulären Konzentration. Da alle Konstrukte auf den gleichen Vektor pCAB18 kloniert wurden und daher der gleichen transkriptionellen und translationellen Regulation unterliegen sollten, kann nur ein weiterer post-translationaler Proteolyseschritt an der pH-anhängigen Induktion von PdeN verantwortlich sein. Die Zielsequenz ist in der kurzen N-terminalen Sequenz von PdeN (MFIRAPNFGRK) zu finden.

4.3.11 Die pH-abhängige Induktion von PdeN wird über den N-Terminus erreicht

Um zu zeigen, dass der N-Terminus von PdeN tatsächlich für die pH-abhängige Induktion verantwortlich ist, wurde die zelluläre Konzentration von PdeN^{C-NT} in Zellen in der post-exponentiellen Phase und über Nacht in LB, in LB pH 5,5 mit und ohne IPTG Induktion untersucht.

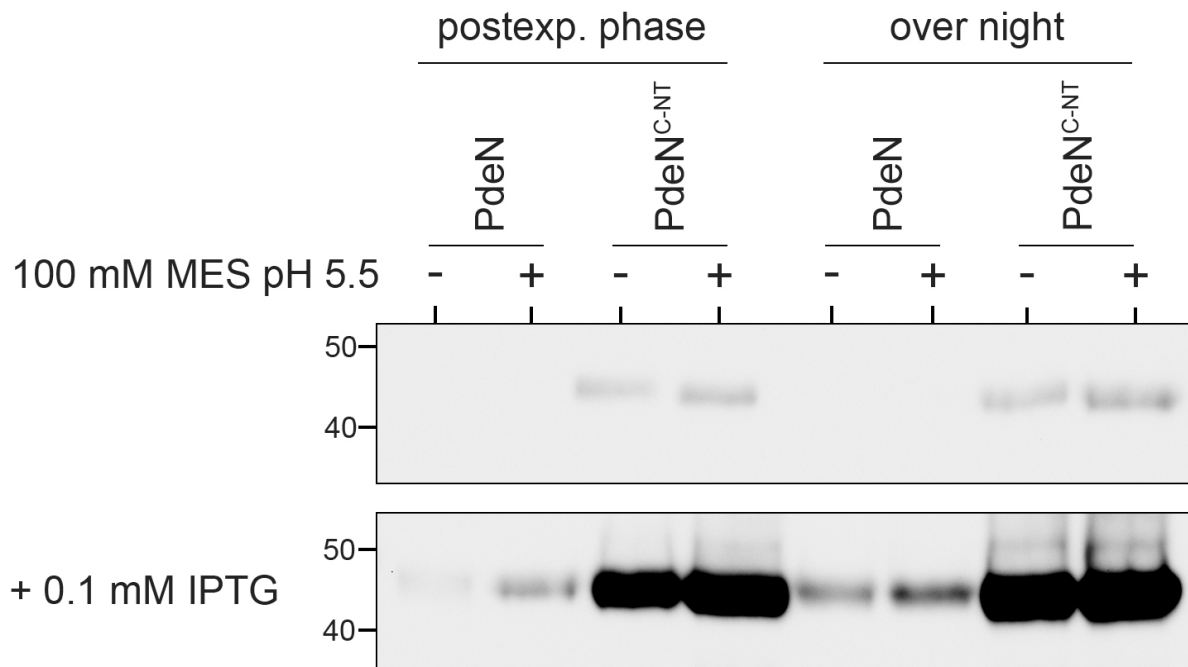


Abb. 29: Der N-Terminus ist für die pH-abhängige Induktion von PdeN verantwortlich

PdeN und die Variante PdeN^{C-NT} mit C-terminalen 6-His-Tag, wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den Stamm *E. coli* K12 W3110 mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden bei 28 °C inkubiert, die Probenentnahme erfolgte in der post-exponentiellen Phase und über Nacht. Wenn angezeigt, wurden die Kulturen ab einer OD₅₇₈ von 0,5 mit 0,1 mM IPTG induziert und mit 100 mM MES pH 5,5 versetzt. Von allen Proben wurden 30 µg aufgetragen. Die jeweiligen PdeN Varianten wurden anschließend durch

Immunoblotting detektiert. Alle hier dargestellten Banden (+/- IPTG) wurden auf einem Blot detektiert und nur für die gezeigte Abbildung getrennt.

Unabhängig von der Anzucht in LB oder LB pH 5,5 sind für die Variante PdeN in der post-exponentiellen Phase und über Nacht keine Banden nachweisbar (Abb. 29, oben). Für die Variante PdeN^{C-NT} lassen sich gegenüber der Kontrolle geringe Mengen an Protein in LB und LB pH 5,5 nachweisen, d.h. PdeN^{C-NT} wird nicht pH-abhängig induziert. Dies belegt, dass N-Terminus von PdeN an der pH-abhängigen Induktion beteiligt sein muss. Durch Zugabe von IPTG werden in (Abb. 29, unten) nur geringe Proteinmengen in der PdeN^{WT} detektiert. Große Mengen wurden für PdeN^{C-NT} beobachtet. Eine Aussage über pH-abhängige Induktion ist auf Grund von IPTG Zugabe und den hohen Proteinmengen nicht möglich. Im Folgenden sollte über Quantifizierungsexperimente die oben genannte Beobachtung bestätigt werden.

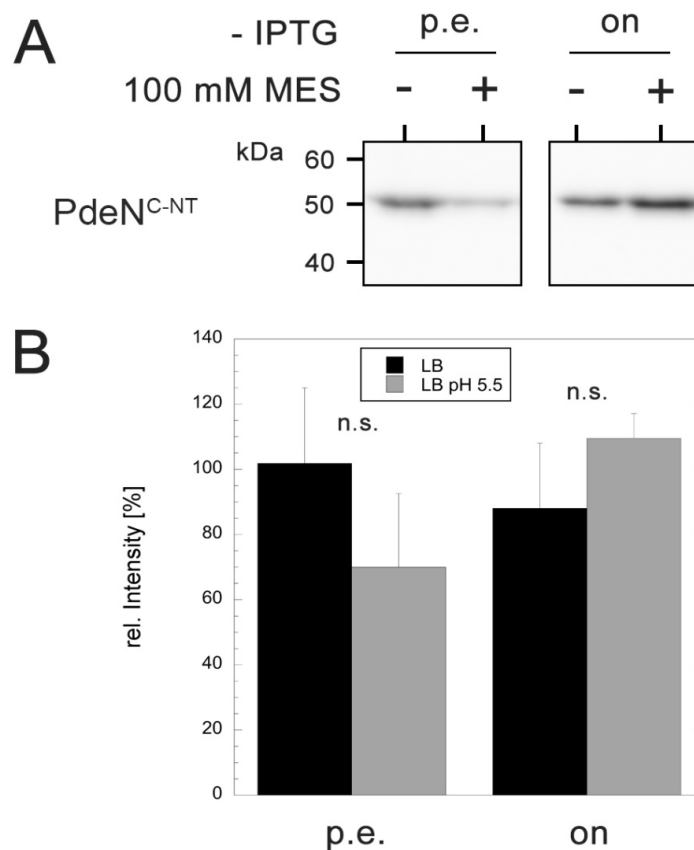


Abb. 30: Der N-Terminus ist für die pH-abhängige Induktion von PdeN verantwortlich

(A) PdeN^{C-NT} mit C-terminalen 6-His-Tag wurde auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den Stamm *E. coli* K12 W3110 mittels TSS übertragen. Die Kulturen wurden mit 100 µg/ml AMP versetzt, bei 28 °C inkubiert, die Probenentnahme erfolgte in der post-exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 2 bis 3) und über Nacht. Wenn angezeigt, wurde ab einer OD₅₇₈ von 0,5 100 mM MES pH 5,5 den Kulturen zugegeben. Von allen Proben wurden 20 µg aufgetragen. Die hier dargestellten Banden von PdeN^{C-NT} wurden auf einem Blot detektiert und sind untereinander vergleichbar. **(B)** Für die Quantifizierung wurden 3 unabhängige Experimente ausgewertet. Hierfür wurden mittels ImageQuant die PdeN^{C-NT} Bandenintensitäten quantifiziert und über die PdeN^{C-NT}-Banden in der post-exponentiellen (p.e.) Phase und über Nacht (on) normalisiert. n.s. kennzeichnet nicht signifikante Werte ($p > 0,1$).

Die Quantifizierungsexperimente bestätigen, dass der N-Terminus von PdeN für die pH-abhängige Proteolyse von PdeN verantwortlich ist (Abb. 30), da PdeN^{C-NT} weder in der post-exponentiellen noch in der stationären Phase signifikante Unterschiede zwischen LB und pH 5,5 zeigt.

4.3.12 PdeD zeigt eine pH-abhängige Induktion

Die fünf CSS-Domänen-PDEs in *E. coli* K12 wurden im Hinblick auf ihre Aminosäuresequenz, ihre Expression während des Wachstums, sowie ihr Redoxverhalten untersucht (Kapitel 4.2). Inwieweit sich eine pH-abhängige Induktion, neben PdeN, auch für weitere Vertreter der Familie der CSS-Domänen-PDEs zeigt soll im Folgenden analysiert werden. Für diesen Nachweis wurden chromosomal FLAG-getaggte Varianten der CSS-Domänen-PDEs in Medium mit und ohne Zugabe von 100 mM MES pH 5,5 bebrütet und die Proteinkonzentration quantifiziert und verglichen.

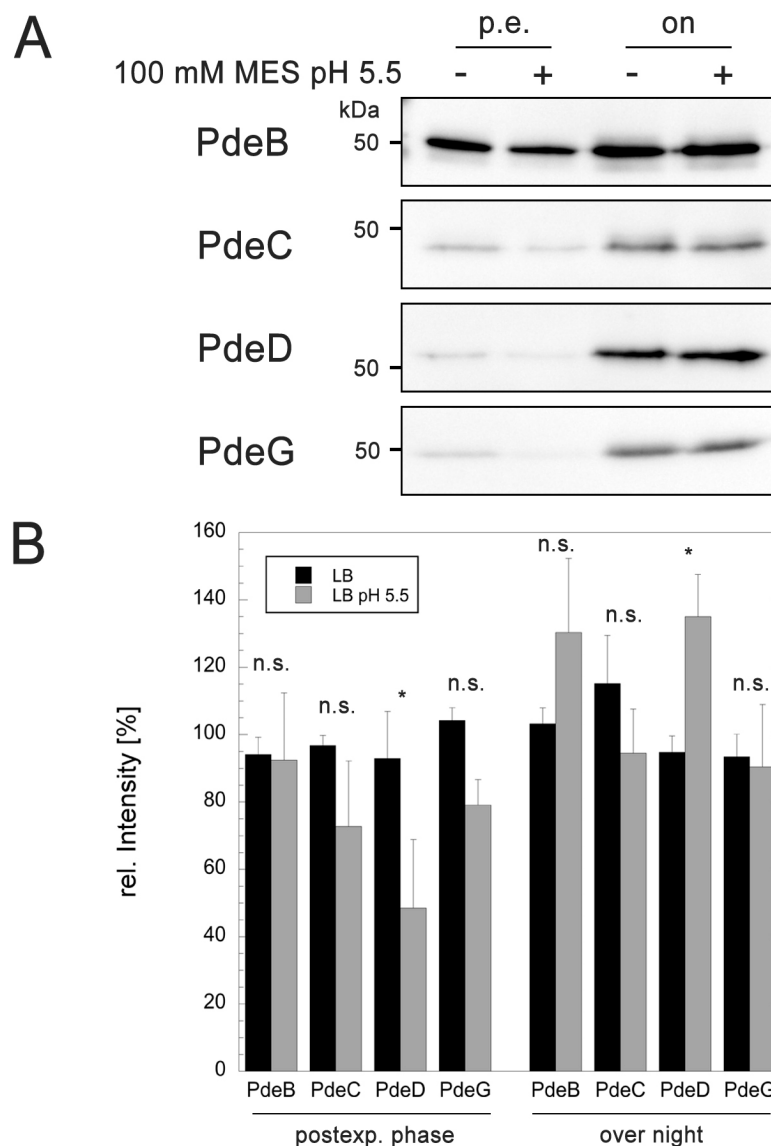


Abb. 31: PdeD zeigt eine pH-abhängige Induktion

(A) Kulturen von chromosomal, C-terminal 3xFLAG getaggtm PdeN^{WT} wurden bei 28 °C inkubiert und, wenn angezeigt, mit 100 mM MES pH 5.5 (pH 5,5) versetzt. Die Probenentnahme erfolgte in der post-exponentiellen Phase (OD₅₇₈ 2 – 3). Probenmengen: PdeB 5 µg, PdeC 15 µg, PdeD 25 µg und PdeG 30 µg. Die CSS-Domänen-PDEs wurden anschließend über Immunoblotting detektiert. (B) Für die Quantifizierung wurden 3 unabhängige Experimente ausgewertet. Hierfür wurden mittels ImageQuant die WT Bandenintensitäten ohne Zugabe von 100 mM MES pH 5,5 quantifiziert. Auf Grund der unterschiedlichen Bandenintensitäten in der post-exponentiellen (p.e.) sowie stationären Phase (on) wurde für beide Wachstumsphasen eine separate Normalisierung durchgeführt. * und ** repräsentieren P-Werte von $p < 0.1$ und < 0.01 berechnet mit einem unabhängigen T-Test in Bezug zur LB_{noS} Kontrolle. Die hier dargestellten Banden wurden jeweils auf einem Blot generiert, variieren aber in den Probenmengen für die einzelnen CSS-Domänen-PDEs.

Die Bandenintensität von PdeD zeigt einen deutlichen Unterschied im Wachstum bei pH 5,5 (Abb. 31A). Ebenso wie bei PdeN (Abb. 25), steigt hier der Proteingehalt von PdeD in den Übernacht-Kulturen LB pH 5,5 (135,0 %) im Vergleich zum normalem LB-Medium (94,7 %) signifikant an (Abb. 31B). Auch in der post-exponentiellen Phase reduziert sich der Proteingehalt von PdeD in LB pH 5,5 signifikant (48,4 %) gegenüber LB-Medium (92,9 %). Die jeweiligen Proteinkonzentrationen (postexp. Phase und Übernacht) von PdeB, PdeC und PdeG zeigen keine signifikanten Änderungen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Wachstumsmedium. Somit sind PdeN und PdeD die einzigen CSS-Domänen-PDE mit pH-abhängiger Induktion des Wildtyp Proteins. Im Fall von PdeD bleibt offen, ob die pH-abhängige Induktion das Resultat verminderter Proteolyse durch DegP und DegQ ist oder über einen ähnlichen N-terminalen Abbaumechanismus hervorgerufen wird.

Im Folgenden sollen die Auswirkungen einer potentiellen pH-anhängigen Induktion, analog zu den Western-Blot Experimenten in Flüssigkultur, auch für Makrokolonien untersucht werden (Abb. 34).

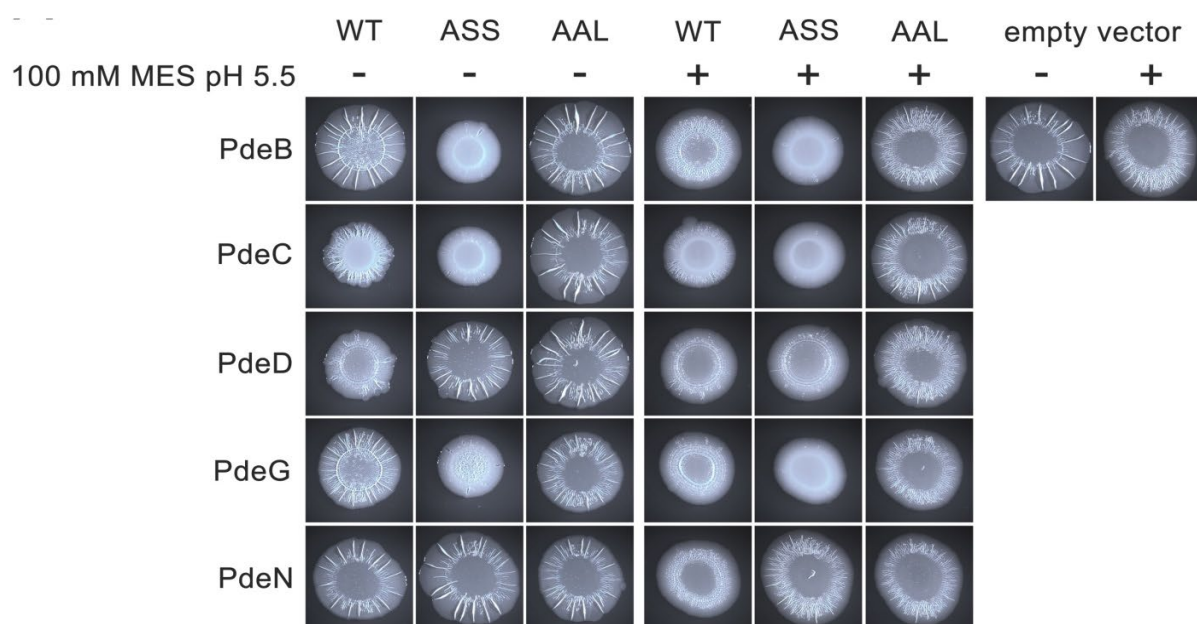


Abb. 32: Auswirkungen der CSS-Domänen-PDEs auf die Makrokoloniemorphologie bei einem Wachstum auf LB_{noS} pH 5,5

(A) Die verschiedenen Versionen der CSS-Domänen-PDEs wurden auf den Niedrig-Kopie Vektor pCAB18 unter Kontrolle des *tac* Promoters kloniert und in den *E. coli* K12 AR3110 Stamm mittels TSS übertragen. Die Makrokolonien wurden auf salz-freiem LB medium unter Zugabe von 100µg/ml AMP und, wenn angezeigt, 100 mM MES pH 5,5 für fünf Tage bei 28 °C inkubiert. WT: Wildtyp CSS-Domänen-PDE; ASS: Cystein im CSS-Motiv durch ein Alanin ersetzt; AAL: Für PDE-Aktivität essentielle Aminosäure Glutaminsäure wurde durch ein Alanin ersetzt; empty vector: Leerplasmid ohne Insert.

PdeB^{WT}, PdeG^{WT} und PdeN^{WT} zeigen eine Aktivierung bei pH 5,5, obwohl keine Induktion der Proteinkonzentration detektiert werden konnte (Abb. 32). Dies lässt vermuten, dass hier eine Aktivierung der Enzymaktivität über den sauren pH-Wert erfolgt.

PdeD^{WT} zeigte keine signifikanten Unterschiede der Makrokoloniemorphologie bei LB_{noS} und LB_{noS} pH 5,5. Bei PdeD^{ASS} scheint speziell die ASS-Variante aktiviert zu werden. Folglich findet diese Aktivierung unabhängig von der periplasmatischen DSB statt.

4.3.13 PdeN ist an der Säurestressadaption von *E. coli* K12 in der stationären Phase beteiligt

In diesem Kapitel sollte überprüft werden, ob PdeN bei der generellen Säurestressadaption von *E. coli* K12 eine Rolle spielt und somit Teil der Säureresistenz ist. Hierfür wurde ein experimenteller Ansatz von Castanie-Cornet aus dem 1999 gewählt (Castanie-Cornet et al., 1999). Der Ablauf des Experiments wird in Abb. 33A detailliert beschrieben. Abb. 33B zeigt die quantifizierten Überlebensraten nach Säurestress des Stamms AR3110 und AR3110 $\Delta pdeN$.

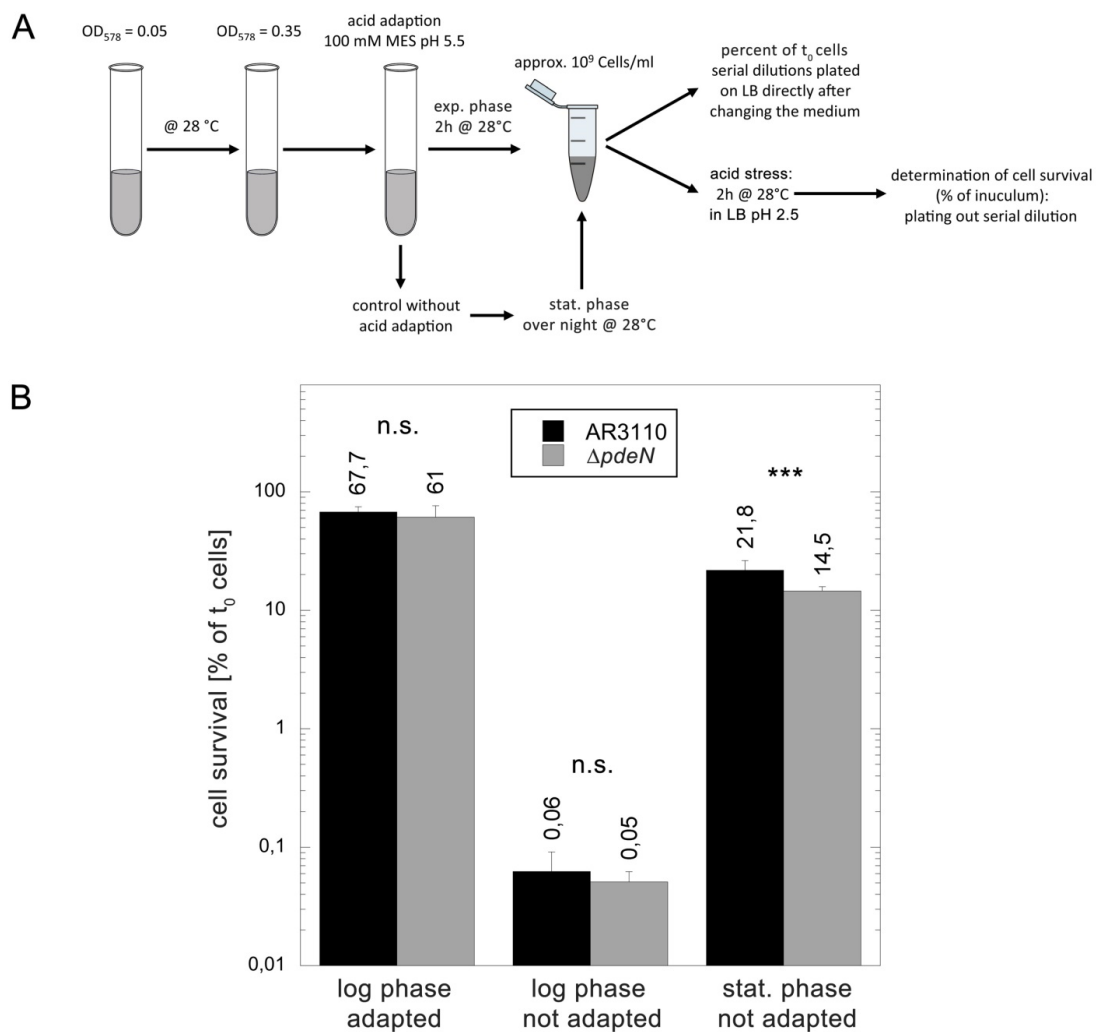


Abb. 33: Säureüberlebensversuchs mit Adaptionsphase nach Castanie-Cornet et al. 1999

A) Frisches LB-Medium wurde mit Übernachtskulturen der Stämme AR3110 und AR3110 $\Delta pdeN$ auf eine OD_{578} von 0,05 beimpft und bei 28 °C bis zu einer OD_{578} von 0,35 inkubiert. Danach wurde die Kultur aufgeteilt. Mit einem Teil erfolgte eine Säureadaption durch Zugabe von 100 mM MES pH 5,5, der andere Teil blieb unbehandelt. Beide Teilkulturen wurden bei 28 °C inkubiert. Die Probenahme erfolgte dann in der exponentiellen Wachstumsphase nach 2 Stunden Inkubation ab einer OD_{578} von ca. 1. Eine weitere Probe wurde nach Inkubation über Nacht aus der stationären Wachstumsphase der nicht-adaptierten Bakterienkultur entnommen. Aus allen Proben wurden jeweils ca. 10^9 Zellen/ml für die Zellzahl zum Zeitpunkt t_0 und für den Säurestress verwendet. Die Säurestressadaption erfolgte für 2 Stunden bei 28 °C durch Resuspension der Zellen in LB-Medium, das auf einen pH 2,5 mittels HCL titriert wurde. Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen, die den Säurestress überlebt haben, wurden serielle Verdünnungen aller Proben auf LB-Platten ausgebracht und die Koloniezahl ausgezählt. Die Überlebensrate wurde dann in Bezug zu den Zellen zum Zeitpunkt t_0 berechnet (Castanie-Cornet et al., 1999). **(B)** Dargestellt werden die Überlebensraten nach dem Säurestress (LB pH 2,5) mit Zellen aus der logarithmischen (log Phase) mit und ohne Säureadaption (adapted / not adapted) und der stationären Wachstumsphase (stat. Phase, not adapted). Die Daten stammen aus unabhängigen experimentellen Triplets. Die Zahlenwerte über den Balken entsprechen den berechneten Mittelwerten [%]; n.s. zeigt nicht-signifikante Unterschiede an, *** zeigt P-Werte von <0.001 an. Die Berechnung erfolgte mit dem unabhängigen t-Test.

Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, sind sehr empfindlich gegenüber Säurestress (Abb. 33B, mittleres Säulenpaar). Ohne vorherige Säureadaption sinkt die Überlebensrate im AR3110^{WT} und AR3110 $\Delta pdeN$ Stamm auf 0,0625 % bzw. 0,051 %

gegenüber dem Ausgangswert. Nach einer zweistündigen Adaptionsphase bei 100 mM MES pH 5,5, steigt dagegen die Überlebensrate beider Stämme, nach Säurestress durch Absenken auf pH 2,5, wieder auf 67,7 % für AR3110 bzw. 61 % für die *pdeN* Mutante (Abb. 33B, linkes Säulenpaar) der Ausgangszellzahl. Die Deletion des PdeN-Gens hat in der exponentiellen Wachstumsphase, unabhängig von der vorherigen Adaptation bei 100 mM MES pH 5,5, keine Auswirkung auf die Säureresistenz von *E. coli* K12.

Die Zellzahl in der stationären Phase nach Wachstum über Nacht steigt sowohl ohne Adaptation bei beiden Stämmen AR3110^{WT} und AR3110 $\Delta pdeN$, *als auch* nach Säurestress gegenüber den nicht adaptierten, exponentiell wachsenden Kulturen deutlich an (signifikanter Unterschied zwischen AR3110^{WT} (21,8 %) und AR3110 $\Delta pdeN$ (14,5 %) ($P < 0,001$) Abb. 33B, rechtes Säulenpaar). Eine Beteiligung von PdeN an der Säureresistenz ist damit nicht auszuschließen. Immerhin verschafft dies dem WT AR3110 Stamm, ausgehend von 10^9 eingesetzten Bakterien, einen respektablen Überlebensvorteil von $7,3 \times 10^7$ Zellen. Beide Stämme sind in der exponentiellen Wachstumsphase, wenn sie zuvor mit 100 mM MES pH 5,5 adaptiert wurden, deutlich resistenter gegenüber einem starken Säurestress als Zellen, die sich in der stationären Phase befinden (Paul & Hirshfield, 2003; Seputiene et al., 2006). Die generelle Stressantwort sollte eine Resistenz gegenüber Säurestress gewährleisten.

5 DISKUSSION

5.1 Charakterisierung der CSS-Domäne von PdeC als DSB/Thiol-Schalter

Herbst et al. beschrieben im Jahr 2018 eine neuartige Klasse von weit verbreiteten CSS-Domänen PDEs, die eine periplasmatische CSS-Domäne mit zwei hoch konservierten Cysteinen im Periplasma aufweisen. Über die TM2 ist zusätzlich eine C-terminale, cytoplasmatische EAL Domäne, mit der katalytischer Aktivität verbunden. In einem *in vivo* Modell konnte der Wirkmechanismus am Beispiel von PdeC gezeigt werden (Herbst & Hengge, 2018). Diese Daten stammen größtenteils aus *in vivo* Experimenten. Um sicherzustellen, dass der postulierte Mechanismus auch *in vitro* mit gereinigtem Protein funktioniert, wurde in dieser Arbeit das Membranprotein PdeC in Detergenz gereinigt und in einer simulierten, nativen Umgebung, den Naodiscs, rekonstituiert.

PdeC besitzt, neben den beiden konservierten periplasmatischen Cysteinen, auch noch drei weitere Cysteine in der cytoplasmatischen EAL Domäne. Über die Konstruktion Cystein-freier PdeC Varianten (PdeC^{EALΔC} und PdeC/N) konnten mögliche intramolekulare Wechselwirkungen der Cysteine durch *in vitro* Experimente ausgeschlossen werden. In der Variante PdeC^{EALΔC} wurden die Cysteine der EAL-Domäne an den Positionen C285, C299 und C489 gegen Serine ausgetauscht. PdeC/N ist ein chimäres Protein aus den transmembranen Segmenten TM1 und TM2, sowie der CSS-Domäne von PdeC und der EAL-Domäne von PdeN, die nativ keine Cysteine besitzt. Somit handelt es sich hier um eine natürlich vorkommende EAL-Domäne, deren PDE-Aktivität bereits experimentell bestätigt wurde (Zheng et al., 2013).

Über Makrokolonieexperimente (Abb. 6) konnte gezeigt werden, dass die oben beschriebenen Konstrukte aktive PDEs sind. Beide Cystein-freien Varianten von PdeC zeigten gegenüber dem PdeC^{WT} eine Abnahme der PDE-Aktivität, was durch eine erhöhte Matrixproduktion in Makrokolonien bestätigt wird und qualifizieren sich deshalb für die weitere Verwendung in PDE-Aktivitätsversuchen.

Bei PdeC^{EALΔC} handelt es sich um eine gentechnisch veränderte Form der EAL-Domäne. Somit könnten die fehlenden Cysteine eine Dimerisierung zweier PdeC EAL-Domäne verhindern, was zu einer Abnahme der Aktivität führen könnte. Es konnte jedoch über Interaktionsversuche gezeigt werden, dass die EAL-Domänen von PdeC keine Protein-Protein Interaktionen eingehen. Daher kann diese Möglichkeit als unwahrscheinlich betrachtet werden. Ferner ist davon auszugehen, dass durch das Fehlen der Cysteine die native Faltung der EAL-Domäne beeinflusst wird. Eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität der EAL-Domäne durch das Einbringen von Mutationen abseits des EAL-Motivs wurde bereits in *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Rao et al., 2009).

Nach der Reinigung und Rekonstitution in Nanodiscs zeigen die Varianten PdeC^{EALΔC} und PdeC/N basale PDE-Aktivität auch ohne DTT Zugabe. Dies bestätigt die von Herbst (2018)

gewonnene Erkenntnis, dass die DSB-Bildung der cytoplasmatischen Cysteine in der periplasmatischen Schleife die *in vitro* Aktivität des PdeC WT inhibiert (Abb. 7). Durch die Zugabe von DTT wird die PDE-Aktivität stimuliert, was darauf hinweist, dass die Reduktion der Cysteine der CSS-Domäne zur freien Thiolform die enzymatische Aktivität der EAL-Domäne beeinflusst. Zusammen mit den Daten von Herbst (2018) charakterisieren diese Ergebnisse die periplasmatische CSS-Domäne als eine neue sensorische Domäne, die die Aktivität dieser c-di-GMP spezifischen PDE durch einen DSB/Thiol-Schalter reguliert.

5.2 CSS-Phosphodiesterasen

5.2.1 Struktureller Vergleich der fünf CSS-Phosphodiesterasen

In der vorangegangenen Arbeit von Herbst (2018) wurde ein Modell für die Aktivität der PdeC entwickelt (Herbst et al., 2018). In dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, warum *E. coli* K12 fünf strukturähnliche Proteine besitzt und welche funktionalen Unterschiede diese auszeichnen. Aus der Literatur ist bisher wenig über die PdeB, PdeD, PdeG und PdeN bekannt. Einige Untersuchungen haben gezeigt, dass PdeD durch das CsgD Protein beeinflusst wird und die Aggregation von Zellen in Flüssigkulturen reduziert (Brombacher et al., 2006; Brombacher et al., 2006). Eine enzymatische Aktivität von PdeD konnte *in vitro* und für PdeN in *Salmonella* nachgewiesen werden (Richter & Hengge, 2016; Zheng et al., 2013).

Der strukturelle Vergleich zeigt, dass sich die Domänenstruktur von PdeB, PdeC, PdeD, PdeG und PdeN nicht voneinander unterscheiden (Abb. 8, Herbst et al., 2018a). Auf Aminosäure-Ebene ergeben sich jedoch Unterschiede, die funktionale Auswirkungen hervorrufen können. Die Sequenz der CSS-Domäne mit den angrenzenden TM1 und TM2 Domänen ist kaum konserviert. Dagegen weisen die EAL-Domänen der CSS-Domänen-PDEs eine sehr hohe Konservierung der Aminosäuresequenz auf, was auf Grund ihrer Aufgabe als funktionale und katalytische Einheit nicht überrascht.

Eine hohe Variabilität ist bereits am N-Terminus der Proteine zu beobachten. Besonders hervorzuheben ist hier das Phenylalanin an Position zwei von PdeN. Diese Aminosäure charakterisiert PdeN als Substrat der *N-End-Rule* (Bachmair et al., 1986). PdeB und PdeG mit einem Arginin (R) an Position zwei können nach erfolgter Translation ebenso zu einem *N-End-Rule* Substrat werden. Selbst das Lysin (K) an 3. Position von PdeD kann als schwaches Substrat der *N-End-Rule* aufgefasst werden. Einzig PdeC mit der Aminosäureabfolge (Met, Ser, His, Arg, Ala, Arg) erfüllt nicht die beschriebenen Kriterien der *N-End-Rule* Substrate (Abb. 8).

Die *N-End-Rule* bezieht sich auf die metabolische Stabilität eines Proteins, d.h. sie beeinflusst die Halbwertszeit eines Proteins in Abhängigkeit der N-terminalen Aminosäure (Varshavsky, 1996). Wie die meisten proteolytischen Kaskaden läuft die *N-End-Rule* in mehreren Schritten ab: (1) die Exposition eines Abbausignals (N-Terminales Abbausignal, N-Degron) auf dem Zielprotein (Substrat) hier das PdeN Protein, (2) rechtzeitige und spezifische Degron-

Erkennung und (3) Abgabe des markierten PdeN Proteins an die geeignete proteolytische Maschine, durch die das Substrat entfaltet und abgebaut wird (Dougan et al., 2010). Der Abbau von Proteinen wird immer durch das Vorhandensein eines Degradationssignals (Degrons) ausgelöst. Dieses befindet sich normalerweise innerhalb des Proteins, das für die Proteolyse bestimmt ist (Schrader et al., 2009). Degrons können strukturell definiert sein, die meisten sind jedoch linearer Natur und befinden sich im Allgemeinen am N- oder C-Terminus der Proteine (Dougan et al., 2010). In *E. coli* werden primäre destabilisierende Reste (Trp, Tyr, Leu und Phe) an sekundäre destabilisierende Reste (Arg, Lys, Met, Asp und Glu) durch L/F-tRNA-Proteintransferase (LFTR) gebunden. Unabhängig von ihrem Ursprung werden alle primären destabilisierenden Rückstände (Trp, Tyr, Leu und Phe) von ClpS (Erkennungskomponente des Clp-Systems) erkannt und zum Abbau an ClpAP abgegeben.

Somit könnte für PdeB, PdeD, PdeG und PdeN die N-terminale Proteinsequenz einen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit des Proteins nach der abgeschlossenen Proteinbiosynthese haben (Bachmair et al., 1986). Eine Auswirkung auf die Funktion sowie Aktivität oder Regulation ist ebenfalls sehr wahrscheinlich.

Trotz Konservierung zeigt die Analyse der CSS-Domäne auf Aminosäure-Ebene interessante Unterschiede. In PdeG findet sich eine Motivänderung des namensgebenden CSS-Motivs zu einem CTS. Es ist aber unwahrscheinlich, dass der Austausch des Serins (S) zu einem Threonin (T) die Ausbildung einer DSB verhindert, da beide Aminosäuren ähnliche chemische Eigenschaften besitzen.

Bisher ist nicht bekannt, warum die beiden Serine im CSS-Motiv hoch konserviert vorliegen. Möglicherweise tragen die geringere Größe des Serins und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken seiner Hydroxyl-Gruppe mit anderen Aminosäuren im Protein dazu bei, dass die beiden periplasmatischen Cysteine der CSS-Domäne ohne sterische Hinderung und durch Stabilisierung eine DSB ausbilden können. Serine sind mit ihren Hydroxyl-Gruppen häufig in aktiven Zentren zu finden, so z. B. im Asp-His-Ser Motiv, das die Grundlage für die hydrolytische Aktivität vieler Proteasen und Lipasen bildet. Hier fungiert Serin, unterstützt durch das Histidin und Aspartat, als Nukleophil, um andere Moleküle zu hydrolisieren.

An den Positionen 58, 69 und 105 der CSS-Phosphodiesterasen liegen in der Nähe des CSS-Motivs polare Aminosäuren wie Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Glutamin (Q) und Glutaminsäure (E) konserviert vor (Abb. 8). An Position 87 dominieren hingegen die unpolare und lipophile Aminosäuren Leucin (L) und Methionin (M). Im Jahr 2010 führten Marques et al. eine bioinformatische Studie zur Analyse des Aminosäuremusters in der Umgebung von DSB durch. Sie zeigte, dass diverse Protein-Superfamilien, in Abhängigkeit ihrer Funktion eine unterschiedliche Aminosäureumgebung der DSB aufwiesen. Interessanterweise finden sich dort negativ geladene Aminosäuren wie Glutamin und Asparaginsäure eher selten, da sie die DSB destabilisieren können (Marques et al., 2010). In Proteinen wie den CSS-Domänen-PDEs, bei denen die DSB als regulatorischer Schalter benutzt wird, ist eine leichte Destabilisierung von Vorteil, um die Reversibilität der DSB zu freien Thiolform zu

gewährleisten. Das gehäufte Vorkommen der polaren Aminosäuren an den Positionen 58, 69 und 105 des Aminosäureabgleichs stützt diese These (Abb. 8).

Die Redoxpotentiale proteinogener Disulfidbrücken liegen zwischen -95 bis -470 mV. Dieser relativ große Bereich von 375 mV wird begründet durch Unterschiede in den pK_a -Werten der Thiole und der Cysteine, der Entropie und der jeweiligen Bindungsstärke (Bechtel & Weerapana, 2017). Der ideale Bindungswinkel für Disulfide beträgt $\pm 90^\circ$. Eine Veränderung dieses Winkels kann eine Steigerung des Redoxpotentials zwischen 10-100 mV bewirken (Katz & Kossiakoff, 1986). DSBs verlieren auch an Stabilität, sobald Spannung auf sie ausgeübt wird. Besonders bei Cysteinen in Schleifen-Regionen kommt es zu solchen strukturellen Spannungen, die das Redoxpotential erhöhen (Bechtel & Weerapana, 2017; Carugo et al., 2003; Luken et al., 2010; Mangan et al., 2016). Die Aminosäuresequenz der CSS-Domäne legt nahe, dass sich im Periplasma auf Grund der DSB eine Protein-Schleife als Sekundärstruktur ausbildet, wobei die Länge der Schleife innerhalb der CSS-Domänen-PDEs variiert. Bei PdeB, PdeC und PdeG beträgt die Distanz zwischen den beiden Cysteinen 30, bei PdeD und PdeN 29 Aminosäuren. Der Unterschied in der Länge der Schleifen könnte sich auf die Redoxpotentiale auswirken und so eine Schalterfunktion der DSB/Thiol-CSS-Domäne ermöglichen.

Obwohl qualitative Aussagen auf Grund fehlender Bestimmung der Redox-Potentiale der DSBs von CSS-Domänen-PDEs in dieser Arbeit nicht möglich sind, stellt sich die Frage, welche Faktoren bei der Bildung von strukturell starken bzw. schwachen DSB eine Rolle spielen und welche Faktoren in den CSS-Domänen-PDEs dazu beitragen. Anhand einer Reihe konstruierter DSBs in T4-Lysozym wurde gezeigt, dass die Stabilität einer DSB vor allem von der Flexibilität der DSB-Region und der Größe der durch die DSB entstehenden Schleife des jeweiligen Proteins abhängt. Schleifenlängen von 94, 122 und 155 Aminosäuren führen zu einer besonders stabilen DSB (Baase et al., 2010; Matsumura et al., 1989). Zu instabilen DSBs führen starre Strukturen, die vor allem an kurzen Schleifen mit einer Länge von 32 und 27 Aminosäuren zu finden sind (Matsumura et al., 1989).

Die CSS-Domänen-PDEs besitzen Schleifenlängen von 29 (PdeD und PdeN) bzw. 30 (PdeB, PdeC und PdeG) Aminosäuren und würden laut Baase et al. (2010) generell unter die Rubrik der instabilen DSBs fallen. Unterstützt wird diese Vermutung durch die strukturelle Analyse der konservierten periplasmatischen Cysteine der CSS-Domänen-PDEs. Diese zeigt, dass einige polare Aminosäuren wie Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Glutamin (Q) und Glutaminsäure (E) in der Nähe der Cysteine die DSB zusätzlich destabilisieren können (Abb. 8). Auch diese Gruppen von Aminosäuren sind, wie oben beschrieben, in der CSS-Domäne gehäuft vorzufinden.

Auf Basis der Daten dieser Arbeit ist jedoch nicht zu erwarten, dass es sich bei PdeN und PdeD um schwache DSBs handelt, da für die WT Protein PDE Aktivität gezeigt werden konnte dagegen für die ASS-Varianten, die nachweislich DegP/Q-abhängig abgebaut werden, nichts nachweisbar war (Abb. 10). Es bleibt zu klären, inwieweit der Unterschied der Schleifenlänge

von nur einer Aminosäure ausschlaggebend für die Stabilität der jeweiligen DSB ist. Es ist jedoch eher unwahrscheinlich, dass ebendieser Unterschied die Stabilität der DSB bei PdeD und PdeN erhöht.

Die Konservierung der EAL-Domäne der CSS-Domänen-PDEs ist im Vergleich zur CSS-Domäne deutlich höher. Sie ist notwendig, um die Funktionalität der c-di-GMP Degradation, die alle CSS-Domänen-PDEs gemeinsam haben, zu ermöglichen. In Abb. 8 werden die essentiellen Aminosäuren für (1) die Bindung von c-di-GMP, (2) die Bindung des Cofaktors Mg^{2+} und (3) die katalytische Aktivität mit entsprechend farblich markierten Sternen gekennzeichnet (Spurbeck et al., 2012). Da für diese essentiellen Aminosäuren in der Gruppe der *E. coli* K12 CSS-Domänen-PDEs keine Varianz festzustellen ist, kann eine Funktionalität der EAL-Domäne aller CSS-Domänen-PDEs erwartet werden. Zwar finden sich einige Abweichungen in der Aminosäuresequenzen, deren Auswirkungen derzeit aber noch unbekannt sind. Ob diese das Potential besitzen, die Aktivität der EAL-Domäne zu beeinflussen, ist nicht geklärt.

Selbst in dem namensgebenden EAL-Motiv finden sich innerhalb der *E. coli* K12 CSS-Domänen-PDEs einige Abweichungen. Bei PdeD ist ein EIL- und bei PdeG und PdeN ein AVL Motiv vorhanden. Diese Änderungen des Motivs haben nachweislich keinen Einfluss auf die Fähigkeit c-di-GMP zu binden (Galperin, 2005).

Festzuhalten bleibt, dass trotz ähnlicher Sekundärstruktur der CSS-Domänen-PDEs die Unterschiede in der Aminosäuresequenz ein relativ großes Potential an Möglichkeiten eröffnen, die Funktion, Stabilität oder Aktivität der CSS-Domänen-PDEs zu beeinflussen. Im nächsten Kapitel sollen die Unterschiede in den Funktionalitäten der CSS-Domänen PDEs *E. coli* K12 weiter verglichen werden.

5.2.2 Funktionaler Vergleich der fünf CSS-Phosphodiesterasen

Im Fall von PdeC kann die Aktivierung der C-terminalen EAL-Domäne über zwei miteinander verbundene Arten erfolgt kann: (1) Durch den Wechsel von der DSB-Form in die freie Thiol-Form, was möglicherweise durch eine DSB-Bildung in der CSS-Domäne wieder rückgängig gemacht werden kann und (2) durch die proteolytische Prozessierung zu einem C-terminalen Fragment, das über die TM2-Domäne immer in der Membran verankert vorliegt. Möglicherweise wird hier über die TM2 als Dimerisierung-Domäne die Stabilität erhöht und somit eine erhöhte PDE Aktivität gewährleistet (Herbst et al., 2018).

Analysen mit Makrokolonien zeigen, dass alle CSS-Domänen-PDEs in ihrer wildtypischen Form als aktive PDEs bezeichnet werden können (Abb. 10), wobei hier deutliche Unterschiede in der Höhe der Aktivität (PdeC, PdeD, PdeB, PdeG und PdeN in abfallender Stärke) zu verzeichnen sind. Bei PdeN bewirkt erst die Induktion des verwendeten Vektors mit IPTG eine deutliche Reduktion der Biofilmmatrixproduktion (Abb. 10). Western-Blot Analysen ergaben, dass die wildtypische Form aller CSS-Domänen-PDEs als stabile einzelne Bande nachgewiesen werden kann und dass ihre ASS-Varianten einer proteolytischen Prozessierung

unterliegen, bei der neben der WT-Bande auch noch eine weitere charakteristische Bande bei ca. 30 kDa entsteht (Abb. 11). Es konnte gezeigt werden, dass ebendieser Abbau durch die periplasmatischen Protease DegP und DegQ erfolgt (Abb. 14).

Die Proteolyse von PdeB, PdeC und PdeG erfolgt auch unter stark reduzierenden Bedingungen nach Zugabe von DTT zum Wachstumsmedium (charakteristische Abbaubande bei ca. 30 kDa sichtbar, Abb. 13). Die proteolytische Prozessierung wurde ebenfalls für PdeB, PdeC und PdeG in *dsbA* Mutanten nachgewiesen und bestätigt, dass die DSB-Bildung zwischen den konservierten Cysteinen in der periplasmatischen Schleife durch reduzierende Bedingungen und durch das DsbA / DsbB-System gefördert wird. Ebenfalls zeigen PdeB, PdeC und PdeG in ihrer DSB-freien Form einen deutlichen Anstieg der Aktivität in Makrokolonien und sind somit über die proteolytische Prozessierung aktivierbar.

Die wildtypischen Formen von PdeD und PdeN zeigen nach Zugabe des Reduktionsmittels DTT oder durch das Ausschalten von DsbA keine bzw. nur in geringen Maß, proteolytische Prozessierung (Abb. 14). Feine Abbaubanden werden erst bei entsprechend hoher Probenmenge sichtbar. Insofern ist davon auszugehen, dass die ASS-Varianten hier artifizielle Zustände darstellen, die in dieser Form während des Wachstums von *E. coli* unter Standardbedingungen nicht vorkommen. Vielmehr ist davon auszugehen, dass PdeD und PdeN strukturelle DSB besitzen, die nicht dem für PdeC publizierten Mechanismus der DegP/Q-abhängigen Proteolyse unterliegen. Diese strukturellen DSBs müssten ein sehr geringes Redox-Potential besitzen, so dass die Zugabe von DTT ($E_0' = -333 \text{ mV}$) (O'Neil, R. S. O. C. G., 2013) und DsbA ($E_0' = -122 \text{ bis } -138 \text{ mV}$) keine Auswirkungen auf den Abbau des Proteins zeigen (Grauschopf et al., 2003; Tan et al., 2005). PdeD und PdeN sind somit durch proteolytische Prozessierung nicht aktivierbar.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass alle CSS-Domänen-PDEs zwar eine ähnliche Struktur besitzen, aber sich die Redox-Biochemie und Proteolyse-Muster unterscheiden.

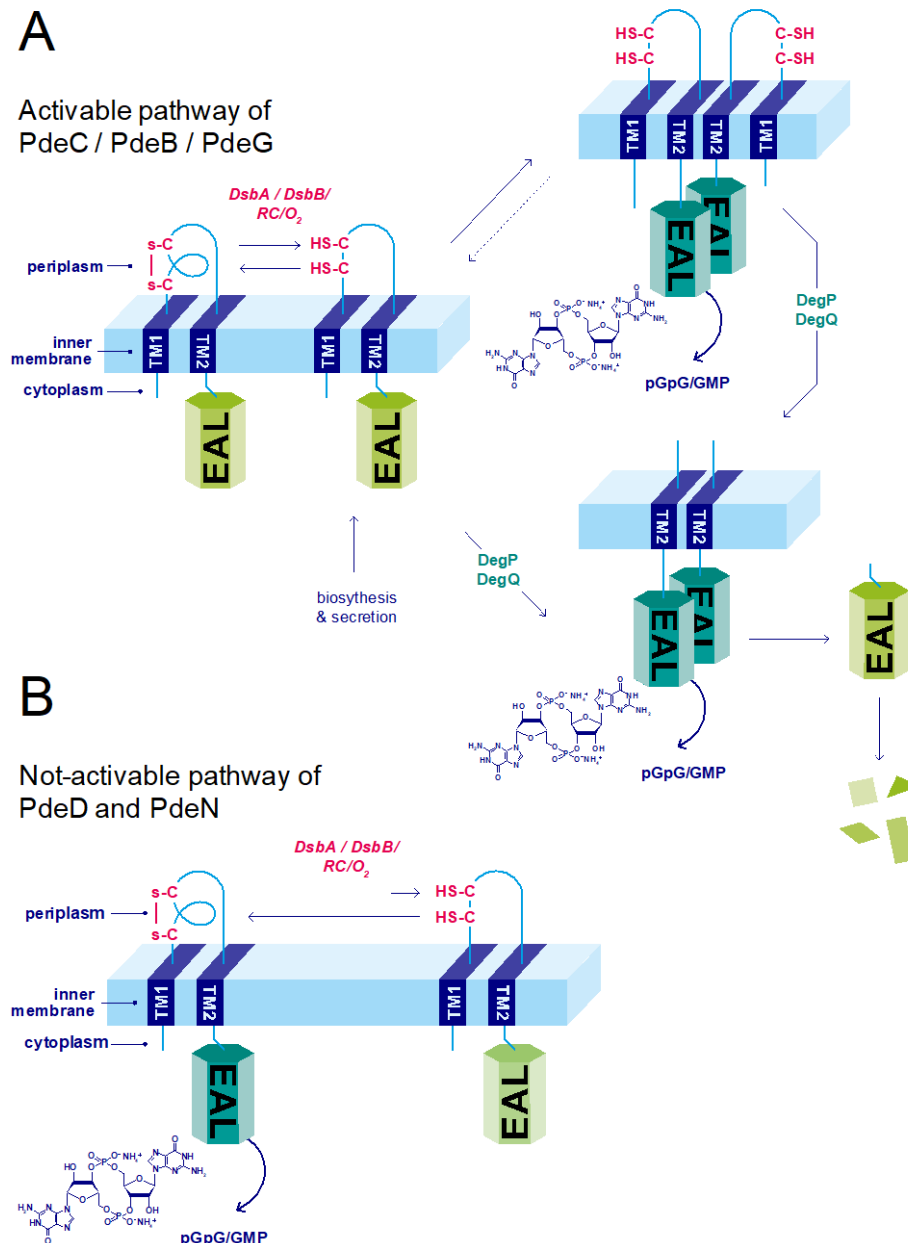


Abb. 34: Modell zur Kontrolle der PDE-Aktivität der CSS-Domänen-PDEs in *E. coli* über den Redox-Status der periplasmatischen CSS-Domäne

(A) Die aktivierbaren CSS-Domänen-PDEs (PdeB, PdeC und PdeG) haben nach Synthese und Einbau in die Membran mehrere Optionen: (1) DSB-Bildung (gefördert durch DsbA / DsbB, wobei Elektronen über die Atmungskette (RC) an Sauerstoff abgegeben werden), (2) Dimerisierung und / oder (3) DegP / DegQ-vermittelte Prozessierung zu einer kürzeren, noch in die Membran einbaubaren TM2 + EAL-Form, die auch dimerisiert. Diese dimeren Formen (WT in nativer oder prozessierter Form) besitzen eine erhöhte PDE-Aktivität (symbolisiert durch dunkelgrüne EAL-Domänen), die c-di-GMP vermehrt abbaut und die Produktion von Biofilm-Matrixkomponenten hemmt. Aerobe Wachstumsbedingungen begünstigen die Bildung von DSB, verhindern die Dimerisierung der nativen Proteine und halten PdeC somit in einer weniger aktiven Form. Proteasen, die an der Weiterverarbeitung des durch DegP / DegQ erzeugten TM2 + EAL-Fragments von PdeC beteiligt sind, müssen noch identifiziert werden (Herbst et al., 2018). **(B)** Die nicht aktivierbaren CSS-Domänen-PDEs (PdeN und PdeD) sind stark abhängig von ihrer Stabilisierung durch die Entstehung der DSB in der CSS-Domäne (strukturelle DSB). PdeD und PdeN zeigen in ihrer wildtypischen Form PDE-Aktivität (symbolisiert durch dunkelgrüne EAL-Domänen), bauen c-di-GMP vermehrt ab und hemmen die Produktion von Biofilm-Matrixkomponenten.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum in den Makrokolonie-Experimenten unterschiedliche Aktivitätsmuster der CSS-Domänen-PDEs beobachtet werden (Abb. 10)? Hier geben die benötigten Probenmengen zur Detektion der Proteine mittels Western-Blots eine erste Antwort (Abb. 12). Obwohl die hier beschriebenen Konstrukte alle gleich kloniert wurden und sich ihre Expression in einer ähnlichen Größenordnung abspielt, werden z.T. deutlich größere Probenmengen benötigt, um eine Detektion zu ermöglichen. Es wird vermutet, dass je mehr Probe zur Detektion aufgetragen werden muss, desto instabiler ist das Protein. Für die WT-Proteine von PdeB, PdeC und PdeG wurden nur geringe Probenmengen aufgetragen und es zeigt sich eine stärkere PDE-Aktivität in den Makrokolonie-Experimenten (nicht induziert) (Abb. 10). Für PdeD werden deutlich höhere Probenmengen für die Visualisierung benötigt und dennoch zeigt sich geringe PDE-Aktivität in Makrokolonien. PdeN konnte in Western-Blots ohne vorherige Induktion der Expression nicht nachgewiesen werden, in Makrokolonien fehlt ohne Induktorzugabe jegliche PDE-Aktivität. Erst durch Zugabe von IPTG wird PdeN im Western-Blot sichtbar und aktiv in Makrokolonien.

Um PDE Aktivität der CSS-Domänen PDEs zeigen zu können müssen zur gleichen Zeit drei Grundvoraussetzungen erfüllt sein. (1) Die Proteine müssen exprimiert werden, (2) in einer gewissen Menge vorhanden sein und (3) in der aktiven Form vorliegen. Im vorherigen Abschnitt wurde bereits detailliert auf Punkt 3 eingegangen. Um den ersten beiden Punkten nachzugehen wurden die chromosomalen Proteinlevel aus den Daten von Sarenko et al. (2017) reproduziert und mit Expressionsdaten von Sommerfeldt et al. (2009) verglichen. Das relative Verhältnis zwischen den experimentell bestimmten Proteinmengen und der Höhe der Expression ist bei allen CSS-Domänen PDEs nicht deckungsgleich, so dass auch hier die in dieser Arbeit aufgezeigten post-translationalen Regulationsmechanismen eine entscheidende Rolle für die PDE Aktivität darstellen.

Nicht alle CSS-Domänen-PDEs werden RpoS-abhängig exprimiert (Beginn der Expression in der post-exponentiellen Phase). Einzig die Expression von PdeN wird in Abhängigkeit von RpoD in der exponentiellen Wachstumsphase, induziert. Auch die Stärke der Expression kann entscheidend für die Wirksamkeit der PDE im Biofilm sein. Die höchste spezifische β -Galaktosidase-Aktivität (Werte in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) wurde von Sommerfeldt et al. (2009) für PdeN mit 0,06 (OD 0,13), gefolgt von PdeB und PdeC mit 0,015 und 0,024 (über Nacht) bestimmt. Sehr geringe Werte wurden für PdeD und PdeG mit 0,008 und 0,005 (über Nacht) festgestellt (Serra et al., 2013a; Sommerfeldt et al., 2009). Diese Expressionsdaten spiegeln aber nur bedingt die experimentell bestimmten Proteinmengen aus dieser Arbeit (Abb. 9) und von Sarenko et al. (2017) wieder.

Ein interessantes Gesamtbild ergeben erst die Proteinmengen der CSS-PDEs im Verlauf der Zeit, also während eines gesamten Wachstumszyklus (Abb. 35). Für PdeN werden die höchsten Proteinmengen ($5,5 \cdot 10^8$ Moleküle pro μg zelluläres Protein) in der exponentiellen Wachstumsphase (OD 0,3) ermittelt. Sie reduzieren sich über Nacht um mehr als das 5,5-fache ($1 \cdot 10^8$ Moleküle pro μg zelluläres Protein). Dies spricht für eine typische RpoD-

abhängige Expression. Der Verlauf der Proteinmengen ist auch auch ursächlich dafür, dass die Aktivität von PdeN in Makrokolonien erst durch künstliche Induktion mit IPTG gezeigt werden konnte. In der späten post-exponentiellen Phase nehmen die Proteinmengen von PdeN weiter ab, wobei gleichzeitig auch keine Steigerung der Aktivität durch Proteolyse, wie für PdeC beschrieben, eintritt.

Die Proteinmenge von PdeB steigt in der post-exponentiellen Wachstumsphase (OD 1) deutlich an ($2 \cdot 10^8$ Moleküle pro μg zelluläres Protein), nimmt bis in die stationäre Wachstumsphase hinein entsprechend zu ($7 \cdot 10^8$ Moleküle pro μg zelluläres Protein) und verringert sich über Nacht wieder ($5 \cdot 10^7$ Moleküle pro μg zelluläres Protein) (Sarenko et al., 2017). Es ist zu erwarten, dass PdeB auch in Makrokolonien die höchste PDE aufzeigt. Dies ist allerdings nicht der Fall. Hier zeigt sich PdeC als „stärkste“ CSS-Domänen PDE (Abb. 10).

PdeC kommt bei OD 1 auf ca. $0,5 \cdot 10^8$ und erreicht über Nacht Werte von ca. $1,5 \cdot 10^8$ Molekülen pro μg zelluläres Protein (Sarenko et al., 2017). Somit scheint für PdeB und PdeC weder die Proteinmenge, noch die Expression ausschlaggebend für den Grad der Aktivität zu sein, sondern vielmehr ein Dritter Faktor - die DegP/Q-abhängige Proteolyse des Proteins mit einhergehender Aktivitätssteigung. Diese ist wiederum abhängig vom DSB System und dem Redoxpotential der Disulfidbrücke zwischen den hoch konservierten Cysteinen in der CSS-Domäne.

Die Proteinmenge von PdeD wird erst ab einer OD 2,5 mit $0,5 \cdot 10^8$ sichtbar und erreicht über Nacht ca. $1,5 \cdot 10^8$ Molekülen pro μg zelluläres Protein. PdeG steigt erst in der späten stationären Phase nach 12 Std. mit $1 \cdot 10^8$ Molekülen pro μg zelluläres Protein etwas an (Sarenko et al., 2017). Währenddessen sinken die Proteinmengen von PdeB und PdeC in der späten stationären Phase deutlich ab. In dieser Phase wird Aktivität von PdeD, aufgrund der strukturellen DSB, kaum von den reduzierenden Wachstumsbedingungen beeinflusst. Auch für PdeG wird im Vergleich zu PdeB und PdeC ein geringerer Abbau beobachtet (Abb. 11). Folglich ist hier von einer stetig zunehmenden PDE-Aktivität über einen längeren Zeitraum auszugehen ist.

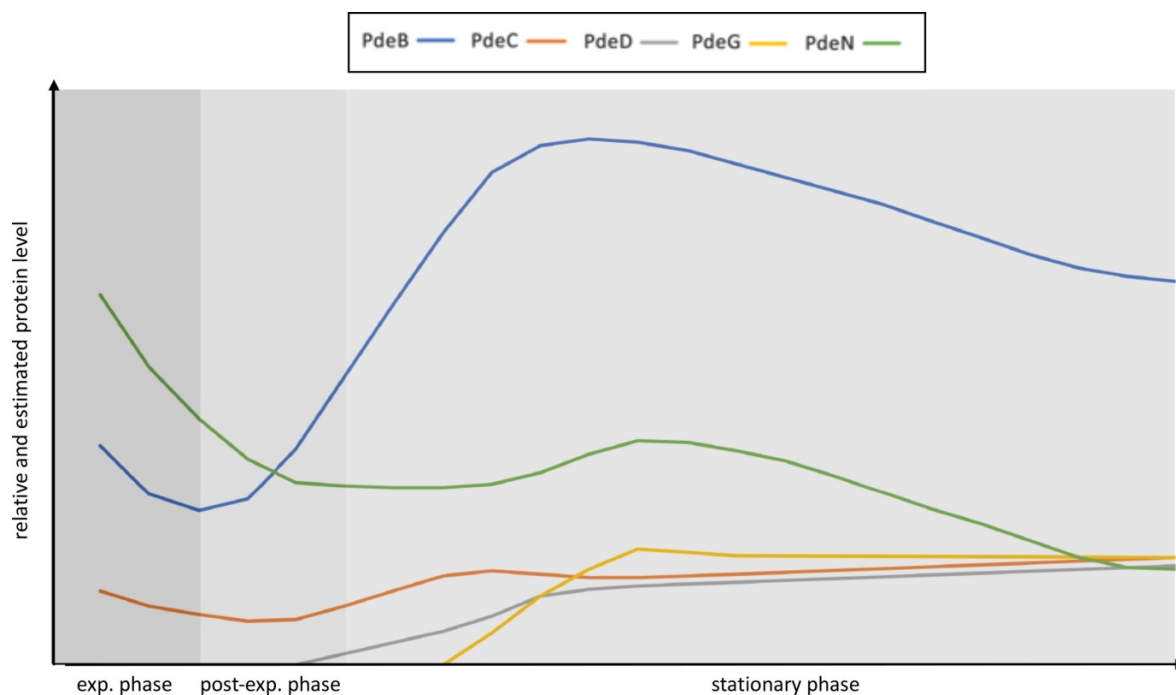


Abb. 35: Theoretischer Verlauf der Proteinmengen der CSS-Domänen-PDEs in Flüssigkultur (LB-Medium)

Diese Abbildung veranschaulicht den Verlauf und die Relationen der Proteinmengen der CSS-Domänen-PDEs zueinander, basierend auf den Daten der Western-Blot-Analyse von Sarenko et al. (2017). Die einzelnen experimentell bestimmten Proteinmengen der CSS-Domänen-PDEs wurden auf die Proteinmenge von PdeN bei OD 0,3 normiert. Die Werte zwischen den Datenpunkten wurden extrapoliert, um einen Kurvenverlauf darzustellen. Diese simplifizierte Abbildung verzichtet auf die Angabe von Einheiten.

5.2.3 Physiologische Funktion der CSS-PDEs

Herbst et al. (2018) untersuchten die physiologische Funktion von PdeC als eine von fünf in *E. coli* K12 beteiligten CSS-Domänen-PDEs bei der Biofilmbildung. In Mutanten, in denen entweder nur PdeC oder alle fünf CSS-Domänen-PDEs ausgeschaltet wurden, zeigte sich, eine dichtere Matrixarchitektur in den Makrokoloniebiofilmen besonders in tieferen Schichten. Da der Sauerstoff der Luft von oben nach unten diffundiert, um im respiratorischen Energiemetabolismus der Zellen innerhalb des Biofilms verbraucht zu werden, bildet sich auf Grund der Dicke einer Makrokolonie (60–70 µm) ein steiler, vertikaler Sauerstoffgradient aus (Herbst et al., 2018; Serra et al., 2013a). In den tieferen Schichten der Makrokolonien herrschen deshalb überwiegend mikroaerobe Bedingungen, die zur Aktivierung von PdeB, PdeC und PdeG beitragen können. Der niedrige Sauerstoffgehalt in den tieferen Schichten limitiert vermutlich auch die Aktivität des DsbA/DsbB Systems, da es, auf Grund der Abwesenheit alternativer Elektronen-Akzeptoren, seine Elektronen nicht mehr der Atmungskette zuleiten kann (Ito & Inaba, 2008). Als Konsequenz würde die DSB-Bildung der CSS-Domäne von PdeC über DsbA / DsbB zum Erliegen kommen und so die Aktivierung von über Dimerisierung und / oder die Effizienz der PDE-Aktivität über die Proteolyse durch DegP/DegQ erhöhen (Herbst et al., 2018).

Für PdeD und PdeN würde es bedeuten, dass unter den limitierten Sauerstoff-Bedingungen, die Inaktivierung des DsbA/DsbB-Systems auf Grund der strukturellen DSB keine Auswirkung auf die PDE-Aktivität hat. Die CSS-PDEs werden nicht reduziert und behalten, sofern sie exprimiert werden und stabil vorliegen, ihre Aktivität bei.

Welchen Vorteil hat *E. coli*, aus evolutionärer Sicht, durch die Existenz eines Systems, bestehend aus drei aktivierbaren (PdeB, PdeC und PdeG) und zwei nicht aktivierbaren CSS-Domänen-PDEs (PdeD und PdeN)? Basierend auf den Erkenntnissen und Analysen dieser Arbeit ist das System als eine Art Netzwerk zur Feinabstimmung der Biofilmbildung zu verstehen. Es kann unter stetig wechselnden oxidierenden, wie reduzierenden Bedingungen innerhalb des Biofilms und während des Wachstums durch eine Kombination aus Expression, Stabilität, Aktivität die Matrixproduktion regulieren.

In natürlichen Umgebungen bestehen bakterielle Biofilme eher selten aus reinen Kulturen einer Art. Vielmehr handelt es sich um ein kooperierendes, koordiniertes, aber auch konkurrierendes Konsortium, bestehend aus einer Vielzahl an verschiedenen bakteriellen Lebensformen (Herbst et al., 2018). Folglich ist es für *E. coli* überlebenswichtig, dass die Ausbildung der Biofilmmatrix einer gewissen Homöostase unterliegt, die sehr robust einer Vielzahl verschiedener Umwelteinflüsse widersteht. Dieses System könnte dazu beitragen, dass *E. coli*, als eines der anpassungsfähigsten Bakterien, sich in verschiedensten ökologischen Nischen angesiedelt hat und sich dort gegen Kompetitoren durchzusetzen vermag.

5.3 pH-abhängige Induktion der CSS-Domänen-Phosphodiesterase PdeN

5.3.1 Regulation und Funktionsweise von PdeN unter sauren Wachstumsbedingungen

PdeN gehört zu den nicht aktivierbaren CSS-Domänen PDEs und besitzt auf Grund der Datenlage dieser Arbeit sehr wahrscheinlich eine strukturelle DSB, die sich nicht durch DTT oder das Fehlen von DsbA reduzieren lässt. Die aktive Form von PdeN ist das gänzliche Protein, in Western-Blot Experimenten über eine 50 kDa Bande nachweisbar. In einer PdeN^{ASS} wurde künstlich über Mutagenese die strukturelle DSB aufgebrochen, was in einem DegP/Q vermittelten Abbau resultierte.

Die pH-abhängige Induktion von PdeN wurde erstmalig in einem Abgleich aller GGDEF/EAL-Domänen Proteinen aus *E. coli* entdeckt. Verglichen wurden 30 verschiedene Stämme mit entsprechenden Gendelektionen auf Wachstumsmedium für Makrokolonien mit einem pH 5.5 (Abb. 19). Einzige PdeN und PdeK Mutanten reagierten auf das saure Wachstumsmedium mit einer Veränderung der Biofilm-Matrixproduktion.

PdeK ist eine c-di-GMP PDE mit einer N-terminalen periplasmatischen GAPES3-Domäne, gefolgt von einer HAMP-Domäne, einer degenerierten GGDEF-Domäne und einer C-terminalen EAL-Domäne (Hengge et al., 2015). PdeK gehört wie PdeN zum Kernsatz von acht

GGDEF / EAL-Domänenproteinen, die in einem Satz von 61 *E. coli*-Genomen, der pathogene, kommensale und probiotische Stämme enthielt, in jedem Stamm absolut konserviert ist (Povolotsky & Hengge, 2016). Bislang ist nicht viel über die GAPES3-Domäne aus PdeK bekannt. Einzig für HAMP-Domänen wird beschrieben, dass sie häufig in bakteriellen Sensor- und Chemotaxis-Proteinen vorkommen, normalerweise als integrale Membranproteine auftreten, als Teil eines Zweikomponenten-Signaltransduktionsweges vorliegen und eine Rolle bei der Regulierung der Phosphorylierung oder Methylierung von homodimeren Rezeptoren spielen können. Eine Verbindung zur Regulation über pH-Werte ist bisher nicht bekannt (Aravind & Ponting, 1999).

Bzgl. PdeN konnte ausgeschlossen werden, dass sich die Expression des Gens während des Wachstums bei pH 5,5 verändert (Abb. 20). Insofern ist davon auszugehen, dass posttranslationale Regulationsmechanismen die Veränderung der Biofilm-Matrixproduktion bei Wachstum von PdeN Mutanten auf saures Medium bewirken. Deletionsmutanten ($\Delta pdeN$ und $\Delta 5CSS$) zeigen bei Wachstum bei pH 5,5 deutlich geringe PDE Aktivitäten und können über Komplettierung mit *pdeN* wieder wildtypische PDE Aktivitäten herstellen (Abb. 21). Insofern ist PdeN^{WT} bei Wachstum auf saurem Medium deutlich aktiver und in der Lage, die Biofilmmatrixstruktur der gesamten Makrokolonie zu beeinflussen.

Diese Aussage ist nicht nur für PdeN^{WT} zutreffend. Auch eine Reduktion der konservierten Cysteine der CSS-Domänen, PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS} (Abb. 22), bewirkt bei Wachstum auf saurem Medium eine deutliche Steigerung der Aktivität, zumindest wenn der Vektor mittels IPTG induziert wurde, also die Gesamtmenge an produziertem Protein deutlich erhöht wird. Im Periplasma gleicht sich der pH-Wert sehr schnell dem pH-Wert des Mediums an. Folglich können sich periplasmatische Proteine nicht richtig falten (Wilks & Slonczewski, 2007). Um dem entgegenzuwirken, wird die Protease-Aktivität von DegP unter sauren pH-Bedingungen inaktiviert. Die damit einhergehende Strukturänderung wird genutzt, um Säure-denaturierte Substratproteine im Periplasma zu binden. Nach Neutralisierung des Wachstumsmediums erlangt DegP zumindest teilweise, seine Protease-Aktivität zurück und spaltet effektiv die bereits gebundenen, denaturierten Substrate oder falsch gefalteten Proteine. So wird die Bildung von potentiell toxischen Aggregaten verhindert und die Zellen werden geschützt (Fu et al., 2018; He et al., 2019).

Eine Erhöhung der Proteinmenge von PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS} bei gleichzeitiger künstlicher Ansäuerung des Wachstumsmedium inaktiviert den Abbau von PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS} durch DegP/Q (Abb. 22). Die gänzliche Form der Proteine erhöht sich und die PDE-Aktivität ist über Makrokolonien nachweisbar. Dieser Punkt ist dahingehend interessant, dass die PDE-Aktivität von PdeN nicht an den Redox-Status der periplasmatischen Cysteine in der CSS-Domäne gebunden ist, sondern nur von der Prozessierung des Proteins abhängt. In diesem Fall kann man von einer DegP/Q vermittelten pH-abhängigen Induktion von PdeN sprechen.

Interessanterweise zeigt sich die pH-abhängige Induktion aber nicht nur bei PdeN^{C76A} und PdeN^{ASS}, sondern konnte sowohl chromosomal als auch Vektorbasiert für PdeN^{WT} gezeigt

werden (Abb. 24 und Abb. 25). Auf Grund der Tatsache, dass die periplasmatische DSB der CSS-Domäne von PdeN als sehr stabil gilt und kein Abbau über Western-Blot Analysen nachgewiesen werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass hier DegP/Q eine Rolle spielen. Dies bestätigt sich über die Versuche mit Knockoutmutanten (Abb. 27). Trotz des Ausschaltens von DegP und DegQ (W3110 $\Delta degP/Q$) wurde eine Induktion von PdeN in über Nacht Proben beobachtet. Dies beweist, dass für PdeN noch ein weiterer post-translationaler Regulationsmechanismus zum Tragen kommt, der pH-abhängig die Proteinmenge von PdeN^{WT} beeinflusst.

5.3.2 N-terminale Regulation von PdeN

Die strukturelle Analyse der CSS-Domänen PDEs in Kapitel 5.2 hat bereits die potentiellen Auswirkungen des an Position 2 des N-Terminus befindlichen Phenylalanins von PdeN beschrieben (Abb. 8). Durch Mutagenese-Experimente der laut *N-End-Rule* destabilisierende Aminosäurereste, sollte untersucht werden, ob ein Abbau durch ClpAP verhindert wird und sich dadurch Proteinstabilität und Proteinlevel in Western-Blot Analysen deutlich erhöhen (Abb. 28). Die PdeN^{F2S} Variante, deren destabilisierendes Phenylalanin an Position zwei durch ein Serin (PdeN^{F2S}) ausgetauscht wurde, zeigte keine bemerkenswerten Unterschiede in den Proteinmengen (Abb. 28). Auch ein Austausch von Ile zu Gly (PdeN^{F2S/I3G}) an Position 3 blieb ohne Einfluss auf die Proteinkonzentration. Die Daten von Herbst et al. (2018) zeigen, dass PdeC deutlich höhere Proteinlevel aufweist als PdeN und dass PdeC zusätzlich nicht als Substrat der *N-End-Rule* in Frage kommt. Deshalb wurde der komplette N-Terminus von PdeN gegen den von PdeC ausgetauscht (PdeN^{C-NT}). Die Western-Blot Analysen zeigen, dass dieser Austausch zu einem drastischen Anstieg der Proteinkonzentration führt (Abb. 28). Die Ergebnisse stammen aus *in vivo* Experimenten, dennoch handelt sich um ein artifizielles System, in dem ein Vektor verwendet wird, der über den *tac* Promoter die Expression des inserierten Gens RpoD-abhängig übernimmt. Zwar ähnelt dieses System der natürlichen Expression von PdeN, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass hier auch Artefakte entstehen. Eine chromosomale Reproduktion der beschriebenen Mutagenese-Experimente wäre lohnenswert. Dennoch gibt das beschriebene Experiment Grund zu der Annahme, dass eine Regulation über den N-Terminus von PdeN erfolgen kann.

Die Erkennung einer N-terminalen destabilisierenden Aminosäure durch ClpS ist ein wesentlicher Schritt beim Abbau von N-End-Rule-Substraten (Erbse et al., 2006; Ninnis et al., 2009; Schmidt et al., 2009; Schuenemann et al., 2009). Er allein reicht aber nicht aus, um den Substratumsatz einzuleiten. Tatsächlich hängt der effiziente Abbau eines Substrats von einem kurzen unstrukturierten Bereich zwischen der gefalteten Domäne und dem N-Degron der Verbindungs-Region ab (Erbse et al., 2006). Eine Analyse dieser Verbindungsregion zeigt, dass mindestens vier Aminosäuren zwischen der gefalteten Domäne und dem N-Degron für eine effiziente Abgabe des Substrats an ClpA erforderlich sind (Wang et al., 2008) und die Zusammensetzung der Verbindungsregion den Substratumsatz maßgeblich beeinflusst

(Dogan et al., 2010; Erbse et al., 2006; Ninnis et al., 2009; Wang et al., 2008). Negativ geladene Aminosäure-Reste in der Nähe eines N-terminalen, destabilisierenden Restes beeinträchtigen die Bindung von ClpS (Erbse et al., 2006).

Die Zusammensetzung der Linker-Region beeinflusst nicht nur die ClpS-Bindung, sondern auch noch andere Aspekte des N-Degron-Umsatzes. Eine Analyse mehrerer ClpA-Substrate identifizierte als zusätzliches Merkmal - ein hydrophobes Element, das sich innerhalb dieser unstrukturierten Verbindungs-Region, vorwiegend 6 bis 12 Reste stromabwärts des N-Degrone, befindet (Ninnis et al., 2009) und für die Substratzufuhr zum ClpAP-Komplex benötigt wird. In Übereinstimmung mit einer Rolle bei der Substratabgabe beeinflusste die Verkürzung der Linker-Region oder eine Mutagenese des hydrophoben Elements die ClpS-Bindung nicht, verhinderte jedoch die Substratabgabe an ClpA und den Abbau durch ClpP. Die Substratübergabe an ClpA ist ein aktiver Prozess, an dem das hydrophobe Element beteiligt ist (Dogan et al., 2010; Varshavsky, 1996).

Überträgt man das Modell auf den N-Terminus von PdeN, lassen sich Parallelen finden, die die Ergebnisse aus Abb. 28 erklären. PdeN besitzt mit dem Phenylalanin eine destabilisierende Aminosäure an Position 2 und erfüllt so die Anforderungen für ein Substrat nach der N-End-Rule. Mit Ausnahme von Arg an Position 4 finden sich keine negativ geladenen Aminosäuren und das Phenylalanin an Position 6 und die Lysine an Position 12-14 sind möglicherweise hydrophobe Reste, die für die Substratzufuhr zum ClpAP-Komplex benötigt werden. Die Tatsache, dass ein starkes hydrophobes Motiv in der Nähe des N-Terminus eines Proteins, das kein N-Degron besitzt, auch durch ClpAP abgebaut werden kann (Erbse et al., 2006; Tobias et al., 1991; Wang et al., 2007), bildet die Grundlage für die Erklärung der niedrigen Proteinlevel der PdeN^{F2S} und PdeN^{F2S/I3G} Varianten in den Western-Blot-Analysen dieser Arbeit (Abb. 30). Isoleucin an Position 3, Alanin an Position 5 und Prolin an Position 6 könnten als hydrophobes Motiv ausreichen, um den Abbau durch ClpAP zu gewährleisten (siehe Abb. 8).

Im Gegensatz zu PdeN zeichnet den PdeC N-Terminus eine sehr hohe Zahl an Aminosäuren aus, die eine negative Ladung tragen: Histidin an Position 3 und 7, Arginin an Position 4 und 6 und Glutaminsäure an Position 8. Diese negativ geladenen Aminosäuren könnten eine Bindung von ClpS an den N-Terminus von PdeC verhindern und zu einer deutlich erhöhten Stabilität der Proteine mit PdeC-N-Terminus (PdeC und PdeC^{C-NT}) führen, die sich in Western-Blots in den hohen Proteinlevel widerspiegelt (Abb. 30).

Trotz der experimentellen Ergebnisse zur Induktion von PdeN bleibt offen, wie es möglich ist, dass sich Änderungen des pH-Wertes im Wachstumsmedium auf das cytosolische Clp-System auswirken, da die periplasmatische innere Membran als stabile Barriere gegenüber Protonen betrachtet werden kann (Wilks & Slonczewski, 2007).

Martinez et al. (2012) haben über radiometrisches GFP kombiniert mit Fluoreszenzmikroskopie dargestellt, dass *E. coli* bei einem Säureschock einen schnellen "Einbruch" des cytoplasmatischen pH-Werts erfährt, der von einer schnellen Erholungsphase

(1 – 2 Minuten) gefolgt wird. Biofilmzellen benötigen unter diesen Bedingungen mit bis zu 7 Minuten deutlich länger (Martinez et al., 2012). Auf Grund dieser Daten ist es eher unwahrscheinlich, dass die kurze Änderung des cytosolischen pH-Wertes eine Beeinflussung der Protease-Aktivität nach sich zieht. Allerdings wurde der Säurestress in den beschriebenen Experimenten nur für einen kurzen Zeitraum erzeugt. Es bleibt offen, inwieweit es den Zellen gelingt, ihren cytosolischen pH-Wert über die Dauer von 24 Stunden (Flüssigkulturen) oder von Tagen (Makrokolonien) bei Wachstum auf saurem Medium konstant zu halten.

Die Analyse der CSS-Domänen-PDEs (Kapitel 4.2) kennzeichnet PdeD und PdeN als nicht aktivierbare CSS-Domänen-PDEs, da Sie in den Makrokolonieexperimenten mit DSB-freien Varianten keine PDE-Aktivität zeigten. Die Aminosäuresequenz des N-Terminus von PdeD lässt vermuten, dass selbst das Lysin (K) an 3. Position von PdeD als schwaches Substrat der *N-End-Rule* aufgefasst werden und folglich auch für PdeD eine Induktion des Proteins in der stationären Phase erklären kann (Abb. 31). Auf Grund der Tatsache, dass PdeD wie auch PdeN wahrscheinlich ebenfalls strukturelle periplasmatische DSB in der CSS-Domäne besitzt, ist die bereits für PdeN beschriebene DegP/DegQ-abhängige und pH-abhängige Induktion eher unwahrscheinlich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass PdeN und PdeD wahrscheinlich über die N-terminale Proteinsequenz von ClpS als Substrat erkannt werden (N-End-Rule) und über ClpA dem Abbau durch ClpP zugeführt werden. Während des Wachstums unter sauren Bedingungen könnte PdeN und PdeD durch die verminderte Aktivität des Clp-Systems stabilisiert werden, was zu einer erfolgreichen Insertion in die innere Membran führt und die PDE-Aktivität von PdeN und PdeD hervorruft (Abb. 36).

planktonischem Wachstum deutlich geringer ausfallen als in der post-exponentiellen Phase. Auch zeigt sich, wie auch von Seputiene et al. (2006) beobachtet, in planktonisch wachsenden Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase eine sehr geringe Überlebensrate nach Säureschock von 0,06 % im WT und 0,05 % in der PdeN-Mutante (Abb. 33). Wird *E. coli* jedoch vorab im Medium mit einem leicht sauren pH 5,5 adaptiert, erhöht sich die Überlebensrate nach dem Säureschock auf 67,7 respektive 61,0 % für WT und PdeN-Mutante. Höchstwahrscheinlich werden hier verschiedene Säureresistenzsysteme während der Anpassung an den leicht sauren pH-Wert adaptiert, was zu der beobachteten Schutzwirkung führt (Paul & Hirshfield, 2003; Seputiene et al., 2006).

Die durchgeführten Säureüberlebensversuche erlauben keine Formulierung eines eindeutigen Wirkungsmechanismus von PdeN bei Säurestress, sondern bestätigen lediglich eine Beteiligung von PdeN. Seine beschriebene Funktion als PDE macht eine Anpassung an Umweltbedingungen über die Einflussnahme auf den c-di-GMP-Spiegel wahrscheinlich. Jedoch sind weitere Regulationen über Protein-Protein Interaktionen, die Proteinaktivitäten induzieren oder kontrollieren, nicht auszuschließen. Fest steht, dass PdeN an der Schnittstelle von zwei sehr komplexen Regulationsmechanismen wirkt, (1) der Regulation der Biofilmbildung über c-di-GMP und (2) der Regulation der Säureresistenzmechanismen. Eine Beteiligung an einem dritten Mechanismus, der *N-End-Rule*, gilt es noch experimentell zu bestätigen.

Die Bewertung der physiologischen Funktionalität der CSS-Domänen-PDEs erfordert die Berücksichtigung zweier Gesichtspunkte: (1) den heterogenen Mikrokosmos einer Makrokolonie und (2) die globalen Umweltbedingungen, die *E. coli* in seinen natürlichen Habitaten erfährt. In einem bakteriellen Biofilm und einer Makrokolonie unterscheiden sich die Umweltbedingungen im Vergleich zu planktonisch wachsenden Zellen. Dies betrifft vor allem den bereits von Herbst et al. (2018) diskutierten Sauerstoffgradienten einer Makrokolonie über ein Diffusionsgefälle von der Grenzfläche zur Luft bis in die tieferen Schichten (Herbst et al., 2018; Serra et al., 2013a). In Abwesenheit von Sauerstoff kann *E. coli* in Anwesenheit eines terminalen Elektronenakzeptors wie das Nitrat-Ion durch Umstellung auf anaerobe Stoffwechselwege weiterwachsen. Fehlt ein Elektronenakzeptor, kann *E. coli* durch Fermentation Energie erzeugen. Um ein Redox-Gleichgewicht zu erreichen, werden Metaboliten des Überlaufs (Acetat, Ethanol, Formiat, Laktat und Succinat) erzeugt und an das Wachstumsmedium abgegeben (Murarka et al., 2010; Yasid et al., 2016). In einem bakteriellen Biofilm besteht deshalb die Möglichkeit des Auftretens niedriger pH-Werte in einzelnen/begrenzten Mikroumgebungen, die die Ausbildung der Biofilmmatrix über PdeN beeinflussen.

E. coli bevorzugt die Kolonisierung des Darms von Säugetieren und Menschen. Die Aufnahme der Bakterien erfolgt vorwiegend über das Wasser und die Nahrung. Im Verlauf der menschlichen Darmpassage ist das Bakterium unterschiedlichsten pH-Werten ausgesetzt. Diese reichen vom pH 1-3,5 im Magen, pH 4,9-6 im Dünndarm bis hin zu pH 7,7- 8,6 im

Dickdarm (Fallingborg, 1999). Der Magen ist also nicht die einzige Hürde mit Bereichen von niedrigen pH-Werten. Weitere Teilabschnitte des Darms, in denen durch metabolische Aktivitäten pH-Gradienten entstehen, erfordern von *E. coli* eine flexible Anpassung an die sich verändernden Bedingungen. Eine der Biofilmmatrixproduktion über PdeN entsprechende Regulation erscheint auch im natürlichen planktonischen Habitat als sinnvoll.

PdeN sticht mit seiner komplexen Regulation aus der Familie der CSS-Domänen-PDEs heraus. Über den N-Terminus und die hohe Expressionsrate wird sichergestellt, dass, falls notwendig, wie bei Wachstum unter sauren Bedingungen genügend Protein in kurzer Zeit verfügbar gemacht werden kann, um die Kontrolle des c-di-GMP Spiegels über die PDE-Aktivität von PdeN zu regulieren (Abb. 36).

6 LITERATUR

- Aravind, L., & Ponting, C. P.** (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 176(1), 111-116. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13650.x
- Axe, D. D., & Bailey, J. E.** (1995). Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 47(1), 8-19. doi:10.1002/bit.260470103
- Baase, W. A., Liu, L., Tronrud, D. E., & Matthews, B. W.** (2010). Lessons from the lysozyme of phage T4. *Protein Sci*, 19(4), 631-641. doi:10.1002/pro.344
- Bachmair, A., Finley, D., & Varshavsky, A.** (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234(4773), 179-186. doi:10.1126/science.3018930
- Backert, S., Bernegger, S., Skórko-Glonek, J., & Wessler, S.** (2018). Extracellular HtrA serine proteases: An emerging new strategy in bacterial pathogenesis. *Cell Microbiol*, 20(6), e12845. doi:10.1111/cmi.12845
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C., & Bardwell, J. C.** (1999). Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell*, 98(2), 217-227. doi:10.1016/s0092-8674(00)81016-8
- Bardwell, J. C., McGovern, K., & Beckwith, J.** (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell*, 67(3), 581-589. doi:10.1016/0092-8674(91)90532-4
- Barembuch, C., & Hengge, R.** (2007). Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol Microbiol*, 65(1), 76-89. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05770.x
- Barends, T. R., Hartmann, E., Griese, J. J., Beitlich, T., Kirienko, N. V., Ryjenkov, D. A. et al. Schlichting, I.** (2009). Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature*, 459(7249), 1015-1018. doi:10.1038/nature07966
- Bayburt, T. H., & Sligar, S. G.** (2010). Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett*, 584(9), 1721-1727. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.024
- Bechtel, T. J., & Weerapana, E.** (2017). From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease. *Proteomics*, 17(6). doi:10.1002/pmhc.201600391
- Bellini, D., Caly, D. L., McCarthy, Y., Bumann, M., An, S. Q., Dow, J. M. et al. Walsh, M. A.** (2014). Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre. *Mol Microbiol*, 91(1), 26-38. doi:10.1111/mmi.12447
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C. A., Ackermann, M. et al. Jenal, U.** (2010). Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell*, 141(1), 107-116. doi:10.1016/j.cell.2010.01.018
- Borch, J., & Hamann, T.** (2009). The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. *Biol Chem*, 390(8), 805-814. doi:10.1515/BC.2009.091
- Branchu, P., Hindré, T., Fang, X., Thomas, R., Gomelsky, M., Claret, L. et al. Martin, C.** (2013). The c-di-GMP phosphodiesterase VmpA absent in *Escherichia coli* K12 strains affects motility and biofilm formation in the enterohemorrhagic O157:H7 serotype. *Vet Immunol Immunopathol*, 152(1-2), 132-140. doi:10.1016/j.vetimm.2012.09.029
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C., & Landini, P.** (2006). Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of

- negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol*, 188(6), 2027-2037. doi:10.1128/JB.188.6.2027-2037.2006
- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A. J., & Landini, P.** (2003). The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 149(Pt 10), 2847-2857. doi:10.1099/mic.0.26306-0
- Brown, P. K., Dozois, C. M., Nickerson, C. A., Zuppardo, A., Terlonge, J., & Curtiss, R.** (2001). MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, 41(2), 349-363. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02529.x
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., & Bautz, E. K.** (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature*, 221(5175), 43-46. doi:10.1038/221043a0
- Busby, S., & Ebright, R. H.** (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol*, 293(2), 199-213. doi:10.1006/jmbi.1999.3161
- Carugo, O., Cemazar, M., Zahariev, S., Hudáky, I., Gáspári, Z., Perczel, A., & Pongor, S.** (2003). Vicinal disulfide turns. *Protein Eng*, 16(9), 637-639. doi:10.1093/protein/gzg088
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F., & Foster, J. W.** (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181(11), 3525-3535. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10348866>
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N. C., Giese, B., Jenal, U., & Schirmer, T.** (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(49), 17084-17089. doi:10.1073/pnas.0406134101
- Chang, Y. Y., & Cronan, J. E.** (1999). Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 33(2), 249-259. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01456.x
- Chen, Y. Y., & Gänzle, M. G.** (2016). Influence of cyclopropane fatty acids on heat, high pressure, acid and oxidative resistance in *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*, 222, 16-22. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.017
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., & Jenal, U.** (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem*, 280(35), 30829-30837. doi:10.1074/jbc.M504429200
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, 16(22), 10881-10890. doi:10.1093/nar/16.22.10881
- Daley, D. O., Rapp, M., Granseth, E., Melén, K., Drew, D., & von Heijne, G.** (2005). Global topology analysis of the *Escherichia coli* inner membrane proteome. *Science*, 308(5726), 1321-1323. doi:10.1126/science.1109730
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6640-6645. doi:10.1073/pnas.120163297
- De Biase, D., & Lund, P. A.** (2015). The *Escherichia coli* Acid Stress Response and Its Significance for Pathogenesis. *Adv Appl Microbiol*, 92, 49-88. doi:10.1016/bs.aambs.2015.03.002
- De Lay, N., & Gottesman, S.** (2012). A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 86(3), 524-538. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08209.x
- Dougan, D. A., Truscott, K. N., & Zeth, K.** (2010). The bacterial N-end rule pathway: expect the unexpected. *Mol Microbiol*, 76(3), 545-558. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07120.x

- Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A., Zahn, R. et al. Bukau, B.** (2006). ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature*, 439(7077), 753-756. doi:10.1038/nature04412
- Fallingborg, J.** (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull*, 46(3), 183-196. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421978>
- Fang, X., Ahmad, I., Blanka, A., Schottkowski, M., Cimdins, A., Galperin, M. Y. et al. Gomelsky, M.** (2014). GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. *Mol Microbiol*, 93(3), 439-452. doi:10.1111/mmi.12672
- Fang, X., & Gomelsky, M.** (2010). A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol*, 76(5), 1295-1305. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07179.x
- Ferenci, T.** (2001). Hungry bacteria--definition and properties of a nutritional state. *Environ Microbiol*, 3(10), 605-611. doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00238.x
- Fitzgerald, D. M., Bonocora, R. P., & Wade, J. T.** (2014). Comprehensive mapping of the *Escherichia coli* flagellar regulatory network. *PLoS Genet*, 10, e1004649. doi:10.1371/journal.pgen.1004649
- Flemming, H. C., & Wingender, J.** (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 623-633. doi:10.1038/nrmicro2415
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S.** (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14(9), 563-575. doi:10.1038/nrmicro.2016.94
- Foster, J. W.** (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol*, 2(11), 898-907. doi:10.1038/nrmicro1021
- Fu, X., Wang, Y., Shao, H., Ma, J., Song, X., Zhang, M., & Chang, Z.** (2018). DegP functions as a critical protease for bacterial acid resistance. *FEBS J*, 285(18), 3525-3538. doi:10.1111/febs.14627
- Galperin, M. Y.** (2005). A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol*, 5, 35. doi:10.1186/1471-2180-5-35
- Gayen, A., Kumar, D., Matheshwaran, S., & Chandra, M.** (2019). Unveiling the Modulating Role of Extracellular pH in Permeation and Accumulation of Small Molecules in Subcellular Compartments of Gram-negative *Escherichia coli* using Nonlinear Spectroscopy. *Anal Chem*, 91(12), 7662-7671. doi:10.1021/acs.analchem.9b00574
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., & Cashel, M.** (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *Journal of bacteriology*, 175(24), 7982-7989. Retrieved from <https://jb.asm.org/content/jb/175/24/7982.full.pdf>
- Girgis, H. S., Liu, Y., Ryu, W. S., & Tavazoie, S.** (2007). A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet*, 3(9), 1644-1660. doi:10.1371/journal.pgen.0030154
- Gorden, J., & Small, P. L.** (1993). Acid resistance in enteric bacteria. *Infect Immun*, 61(1), 364-367. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8418063>
- Grainger, D. C., Hurd, D., Harrison, M., Holdstock, J., & Busby, S. J.** (2005). Studies of the distribution of *Escherichia coli* cAMP-receptor protein and RNA polymerase along the *E. coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(49), 17693-17698. doi:10.1073/pnas.0506687102

- Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R., & Hogle, J. M.** (1998). The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat Struct Biol*, 5(4), 294-303. doi:10.1038/nsb0498-294
- Grauschopf, U., Fritz, A., & Glockshuber, R.** (2003). Mechanism of the electron transfer catalyst DsbB from *Escherichia coli*. *EMBO J*, 22(14), 3503-3513. doi:10.1093/emboj/cdg356
- Grigorova, I. L., Phleger, N. J., Mutalik, V. K., & Gross, C. A.** (2006). Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(14), 5332-5337. doi:10.1073/pnas.0600828103
- Hall, C. W., & Mah, T. F.** (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 41(3), 276-301. doi:10.1093/femsre/fux010
- Hammar, M. R., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A., & Normark, S.** (1995). Expression of two csg operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*, 18(4), 661-670. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18040661.x
- Hansen, G., & Hilgenfeld, R.** (2013). Architecture and regulation of HtrA-family proteins involved in protein quality control and stress response. *Cell Mol Life Sci*, 70(5), 761-775. doi:10.1007/s00018-012-1076-4
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S. et al. Horiuchi, T.** (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol*, 2, 2006.0007. doi:10.1038/msb4100049
- Hayes, E. T., Wilks, J. C., Sanfilippo, P., Yohannes, E., Tate, D. P., Jones, B. D. et al. Slonczewski, J. L.** (2006). Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol*, 6, 89. doi:10.1186/1471-2180-6-89
- He, D., Zhang, M., Liu, S., Xie, X., & Chen, P. R.** (2019). Protease-Mediated Protein Quality Control for Bacterial Acid Resistance. *Cell Chem Biol*, 26(1), 144-150.e3. doi:10.1016/j.chembiol.2018.10.014
- Helmann, J. D.** (1999). Anti-sigma factors. *Curr Opin Microbiol*, 2, 135-141. doi:10.1016/S1369-5274(99)80024-1
- Hengge, R.** (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 7(4), 263-273. doi:10.1038/nrmicro2109
- Hengge, R.** (2011a). Stationary-Phase Gene Regulation in *Escherichia coli* §. *EcoSal Plus*, 4(2). doi:10.1128/ecosalplus.5.6.3
- Hengge, R.** (2020). Linking bacterial growth, survival, and multicellularity - small signaling molecules as triggers and drivers. *Curr Opin Microbiol*, 55, 57-66. doi:10.1016/j.mib.2020.02.007
- Hengge, R., Galperin, M. Y., Ghigo, J. M., Gomelsky, M., Green, J., Hughes, K. T. et al. Landini, P.** (2015). Systematic Nomenclature for GGDEF and EAL Domain-Containing Cyclic Di-GMP Turnover Proteins of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 198(1), 7-11. doi:10.1128/JB.00424-15
- Hengge, R., Gründling, A., Jenal, U., Ryan, R., & Yildiz, F.** (2016). Bacterial Signal Transduction by Cyclic Di-GMP and Other Nucleotide Second Messengers. *J Bacteriol*, 198(1), 15-26. doi:10.1128/JB.00331-15
- Hengge, R., Häussler, S., Pruteanu, M., Stülke, J., Tschowri, N., & Turgay, K.** (2019). Recent Advances and Current Trends in Nucleotide Second Messenger Signaling in Bacteria. *J Mol Biol*, 431(5), 908-927. doi:10.1016/j.jmb.2019.01.014

- Hengge, R. (2011b). The general stress response in Gram-negative bacteria. In *Bacterial Stress Responses, Second Edition* (pp. 251-289). American Society of Microbiology.
- Hengge, R.** (2016). Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1707), 20150498. Retrieved from <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rstb.2015.0498>
- Heras, B., Kurz, M., Shouldice, S. R., & Martin, J. L.** (2007). The name's bond. disulfide bond. *Curr Opin Struct Biol*, 17(6), 691-698. doi:10.1016/j.sbi.2007.08.009
- Herbst, S., & Hengge, R. (2018). *Die Funktion der redox-sensitiven periplasmatischen CSS-Domäne in der c-di-GMP-spezifischen Phosphodiesterase PdeC bei der Biofilmbildung in Escherichia coli*. Humboldt Universität zu Berlin, Berlin.
- Herbst, S., Lorkowski, M., Sarenko, O., Nguyen, T. K. L., Jaenicke, T., & Hengge, R.** (2018). Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di-GMP phosphodiesterase. *EMBO J*. doi:10.15252/embj.201797825
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R.** (2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev*, 39(5), 649-669. doi:10.1093/femsre/fuv015
- Hollands, K., Busby, S. J., & Lloyd, G. S.** (2007). New targets for the cyclic AMP receptor protein in the Escherichia coli K-12 genome. *FEMS Microbiol Lett*, 274(1), 89-94. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00826.x
- Hughes, K. T., & Mathee, K.** (1998). The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol*, 52, 231-286. doi:10.1146/annurev.micro.52.1.231
- Inaba, K., & Ito, K.** (2008). Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim Biophys Acta*, 1783(4), 520-529. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.11.006
- Ishihama, A.** (2000). Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol*, 54, 499-518. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.499
- Ito, K., & Inaba, K.** (2008). The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol*, 18(4), 450-458. doi:10.1016/j.sbi.2008.02.002
- Janga, S. C., Salgado, H., Collado-Vides, J., & Martínez-Antonio, A.** (2007). Internal versus external effector and transcription factor gene pairs differ in their relative chromosomal position in Escherichia coli. *J Mol Biol*, 368(1), 263-272. doi:10.1016/j.jmb.2007.01.019
- Jenal, U., & Malone, J.** (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu Rev Genet*, 40, 385-407. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090423
- Jenal, U., Reinders, A., & Lori, C.** (2017). Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol*, 15(5), 271-284. doi:10.1038/nrmicro.2016.190
- Jiang, J., Zhang, X., Chen, Y., Wu, Y., Zhou, Z. H., Chang, Z., & Sui, S. F.** (2008). Activation of DegP chaperone-protease via formation of large cage-like oligomers upon binding to substrate proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(33), 11939-11944. doi:10.1073/pnas.0805464105
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., & Nyström, T.** (2002). Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev*, 16(10), 1260-1270. doi:10.1101/gad.227902
- Kamitani, S., Akiyama, Y., & Ito, K.** (1992). Identification and characterization of an Escherichia coli gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *EMBO J*, 11(1), 57-62. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1740115>

- Kanjee, U., Gutsche, I., Ramachandran, S., & Houry, W. A.** (2011). The enzymatic activities of the *Escherichia coli* basic aliphatic amino acid decarboxylases exhibit a pH zone of inhibition. *Biochemistry*, 50(43), 9388-9398. doi:10.1021/bi201161k
- Kanjee, U., & Houry, W. A.** (2013). Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol*, 67, 65-81. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155708
- Kaper, J. B.** (2005). Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 295(6-7), 355-356. doi:10.1016/j.ijmm.2005.06.008
- Katz, B. A., & Kossiakoff, A.** (1986). The crystallographically determined structures of atypical strained disulfides engineered into subtilisin. *J Biol Chem*, 261(33), 15480-15485. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096989>
- Kim, D. Y., & Kim, K. K.** (2005). Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol*, 38(3), 266-274. doi:10.5483/bmbrep.2005.38.3.266
- Kim, S., Grant, R. A., & Sauer, R. T.** (2011). Covalent linkage of distinct substrate degrons controls assembly and disassembly of DegP proteolytic cages. *Cell*, 145(1), 67-78. doi:10.1016/j.cell.2011.02.024
- Kim, S., & Sauer, R. T.** (2012). Cage assembly of DegP protease is not required for substrate-dependent regulation of proteolytic activity or high-temperature cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(19), 7263-7268. doi:10.1073/pnas.1204791109
- Klauck, G., Serra, D. O., Possling, A., & Hengge, R.** (2018). Spatial organization of different sigma factor activities and c-di-GMP signalling within the three-dimensional landscape of a bacterial biofilm. *Open Biol*, 8. doi:10.1098/rsob.180066
- Kobayashi, T., Kishigami, S., Sone, M., Inokuchi, H., Mogi, T., & Ito, K.** (1997). Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22), 11857-11862. doi:10.1073/pnas.94.22.11857
- Kolmar, H., Waller, P. R., & Sauer, R. T.** (1996). The DegP and DegQ periplasmic endoproteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J Bacteriol*, 178(20), 5925-5929. doi:10.1128/jb.178.20.5925-5929.1996
- Kolter, R., Siegele, D. A., & Tormo, A.** (1993). The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol*, 47, 855-874. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.004231
- Krojer, T., Sawa, J., Huber, R., & Clausen, T.** (2010). HtrA proteases have a conserved activation mechanism that can be triggered by distinct molecular cues. *Nat Struct Mol Biol*, 17(7), 844-852. doi:10.1038/nsmb.1840
- Krojer, T., Sawa, J., Schäfer, E., Saibil, H. R., Ehrmann, M., & Clausen, T.** (2008). Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP. *Nature*, 453(7197), 885-890. doi:10.1038/nature07004
- Landeta, C., Boyd, D., & Beckwith, J.** (2018). Disulfide bond formation in prokaryotes. *Nat Microbiol*, 3, 270-280. doi:10.1038/s41564-017-0106-2
- Lange, R., Fischer, D., & Hengge-Aronis, R.** (1995). Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 177(16), 4676-4680. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642494>
- Lange, R., & Hengge-Aronis, R.** (1991). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 5(1), 49-59. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb01825.x

- Lemke, J. J., Durfee, T., & Gourse, R. L.** (2009). DksA and ppGpp directly regulate transcription of the *Escherichia coli* flagellar cascade. *Mol Microbiol*, 74(6), 1368-1379. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06939.x
- Lewis, K.** (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 107-131. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_6
- Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E., & Hengge, R.** (2013). The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J*, 32(14), 2001-2014. doi:10.1038/emboj.2013.120
- Lipinska, B., Sharma, S., & Georgopoulos, C.** (1988). Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Res*, 16(21), 10053-10067. doi:10.1093/nar/16.21.10053
- Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J. E., Zhao, K., Jin, D. J., & Blattner, F. R.** (2005). Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 280(16), 15921-15927. doi:10.1074/jbc.M414050200
- Lonetto, M., Gribskov, M., & Gross, C. A.** (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol*, 174(12), 3843-3849. doi:10.1128/jb.174.12.3843-3849.1992
- Luken, B. M., Winn, L. Y., Emsley, J., Lane, D. A., & Crawley, J. T.** (2010). The importance of vicinal cysteines, C1669 and C1670, for von Willebrand factor A2 domain function. *Blood*, 115(23), 4910-4913. doi:10.1182/blood-2009-12-257949
- Madan Babu, M., & Teichmann, S. A.** (2003). Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 31(4), 1234-1244. doi:10.1093/nar/gkg210
- Mangan, M. S., Bird, C. H., Kaiserman, D., Matthews, A. Y., Hitchen, C., Steer, D. L. et al. Bird, P. I.** (2016). A Novel Serpin Regulatory Mechanism: SerpinB9 IS REVERSIBLY INHIBITED BY VICINAL DISULFIDE BOND FORMATION IN THE REACTIVE CENTER LOOP. *J Biol Chem*, 291(7), 3626-3638. doi:10.1074/jbc.M115.699298
- Marques, J. R., da Fonseca, R. R., Drury, B., & Melo, A.** (2010). Amino acid patterns around disulfide bonds. *Int J Mol Sci*, 11, 4673-4686. doi:10.3390/ijms11114673
- Martínez-Antonio, A., Janga, S. C., Salgado, H., & Collado-Vides, J.** (2006). Internal-sensing machinery directs the activity of the regulatory network in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*, 14(1), 22-27. doi:10.1016/j.tim.2005.11.002
- Martinez, K. A., Kitko, R. D., Mershon, J. P., Adcox, H. E., Malek, K. A., Berkmen, M. B., & Slonczewski, J. L.** (2012). Cytoplasmic pH response to acid stress in individual cells of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* observed by fluorescence ratio imaging microscopy. *Appl Environ Microbiol*, 78(10), 3706-3714. doi:10.1128/AEM.00354-12
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G.** (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(4), 910-938. doi:10.1128/MMBR.00020-06
- Matsumura, M., Becktel, W. J., Levitt, M., & Matthews, B. W.** (1989). Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(17), 6562-6566. doi:10.1073/pnas.86.17.6562
- Maurer, L. M., Yohannes, E., Bondurant, S. S., Radmacher, M., & Slonczewski, J. L.** (2005). pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 187(1), 304-319. doi:10.1128/JB.187.1.304-319.2005
- Mika, F., Busse, S., Possling, A., Berkholz, J., Tschowri, N., Sommerfeldt, N. et al. Hengge, R.** (2012). Targeting of *csgD* by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 84(1), 51-65. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08002.x

- Mika, F., & Hengge, R.** (2014). Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA Biol*, 11(5), 494-507. doi:10.4161/rna.28867
- Miller, J. H.** (1972). Experiments in molecular genetics. Retrieved from http://books.google.de/books?id=PtVpAAAAAMAAJ&hl=&source=gbs_api
- Miroux, B., & Walker, J. E.** (1996). Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260(3), 289-298. doi:10.1006/jmbi.1996.0399
- Missiakas, D., Schwager, F., & Raina, S.** (1995). Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 14, 3415-3424. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628442>
- Morgan, J. L., McNamara, J. T., & Zimmer, J.** (2014). Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat Struct Mol Biol*, 21(5), 489-496. doi:10.1038/nsmb.2803
- Mujacic, M., & Baneyx, F.** (2007). Chaperone Hsp31 contributes to acid resistance in stationary-phase *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 73(3), 1014-1018. doi:10.1128/AEM.02429-06
- Murarka, A., Clomburg, J. M., Moran, S., Shanks, J. V., & Gonzalez, R.** (2010). Metabolic analysis of wild-type *Escherichia coli* and a pyruvate dehydrogenase complex (PDHC)-deficient derivative reveals the role of PDHC in the fermentative metabolism of glucose. *J Biol Chem*, 285(41), 31548-31558. doi:10.1074/jbc.M110.121095
- Ninnis, R. L., Spall, S. K., Talbo, G. H., Truscott, K. N., & Dougan, D. A.** (2009). Modification of PATase by L/F-transferase generates a ClpS-dependent N-end rule substrate in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 28(12), 1732-1744. doi:10.1038/emboj.2009.134
- Noguchi, K., Riggins, D. P., Eldahan, K. C., Kitko, R. D., & Slonczewski, J. L.** (2010). Hydrogenase-3 contributes to anaerobic acid resistance of *Escherichia coli*. *PLoS One*, 5(4), e10132. doi:10.1371/journal.pone.0010132
- Notley-McRobb, L., King, T., & Ferenci, T.** (2002). rpoS mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J Bacteriol*, 184(3), 806-811. doi:10.1128/jb.184.3.806-811.2002
- Notley, L., & Ferenci, T.** (1996). Induction of RpoS-dependent functions in glucose-limited continuous culture: what level of nutrient limitation induces the stationary phase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 178(5), 1465-1468. doi:10.1128/jb.178.5.1465-1468.1996
- Nyström, T.** (2004). Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition. *Mol Microbiol*, 54(4), 855-862. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04342.x
- O'Neil, M. J. A. B., R. S. O. C. G.** (2013). The Merck Index.
- Ogasawara, H., Yamamoto, K., & Ishihama, A.** (2010). Regulatory role of MlrA in transcription activation of csgD, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 312(2), 160-168. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.02112.x
- Ogasawara, H., Yamamoto, K., & Ishihama, A.** (2011). Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis. *J Bacteriol*, 193(10), 2587-2597. doi:10.1128/JB.01468-10
- Okegbe, C., Price-Whelan, A., & Dietrich, L. E.** (2014). Redox-driven regulation of microbial community morphogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 18, 39-45. doi:10.1016/j.mib.2014.01.006
- Onder, O., Turkarslan, S., Sun, D., & Daldal, F.** (2008). Overproduction or absence of the periplasmic protease DegP severely compromises bacterial growth in the absence of the

- dithiol: disulfide oxidoreductase DsbA. *Mol Cell Proteomics*, 7(5), 875-890. doi:10.1074/mcp.M700433-MCP200
- Paul, B., & Hirshfield, I.** (2003). The effect of acid treatment on survival and protein expression of a laboratory K-12 strain *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 154(2), 115-121. doi:10.1016/S0923-2508(02)00011-6
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W. C., Blair, D. F., & Harshey, R. M.** (2010). The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell*, 38(1), 128-139. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.001
- Pérez-Martín, J., & de Lorenzo, V.** (1997). Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annu Rev Microbiol*, 51, 593-628. doi:10.1146/annurev.micro.51.1.593
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehrlis, A., & Hengge, R.** (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 22(17), 2434-2446. doi:10.1101/gad.475808
- Pfiffer, V., Sarenko, O., Possling, A., & Hengge, R.** (2019). Genetic dissection of *Escherichia coli*'s master diguanylate cyclase DgcE: Role of the N-terminal MASE1 domain and direct signal input from a GTPase partner system. *PLoS Genet*, 15(4), e1008059. doi:10.1371/journal.pgen.1008059
- Pitt-Rivers, R., & Impiombato, F. S.** (1968). The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochem J*, 109(5), 825-830. doi:10.1042/bj1090825
- Povolotsky, T. L., & Hengge, R.** (2016). Genome-Based Comparison of Cyclic Di-GMP Signaling in Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Strains. *J Bacteriol*, 198(1), 111-126. doi:10.1128/JB.00520-15
- Rao, F., Qi, Y., Chong, H. S., Kotaka, M., Li, B., Li, J. et al. Liang, Z. X.** (2009). The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. *J Bacteriol*, 191(15), 4722-4731. doi:10.1128/JB.00327-09
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M.** (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(6), 1760-1765. doi:10.1073/pnas.0813167106
- Richard, H., & Foster, J. W.** (2004). *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J Bacteriol*, 186(18), 6032-6041. doi:10.1128/JB.186.18.6032-6041.2004
- Richter, A. M., & Hengge, R. (2016). *c-di-GMP-abhängige Signaltransduktion bei der Kontrolle der Cellulose-Synthese in Escherichia coli Biofilmen*.
- Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G., & Beckwith, J.** (1997). Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol*, 179(21), 6602-6608. doi:10.1128/jb.179.21.6602-6608.1997
- Ritchie, T. K., Grinkova, Y. V., Bayburt, T. H., Denisov, I. G., Zolnerciks, J. K., Atkins, W. M., & Sligar, S. G.** (2009). Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol*, 464, 211-231. doi:10.1016/S0076-6879(09)64011-8
- Roe, A. J., O'Byrne, C., McLaggan, D., & Booth, I. R.** (2002). Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*, 148(Pt 7), 2215-2222. doi:10.1099/00221287-148-7-2215
- Römling, U., Galperin, M. Y., & Gomelsky, M.** (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77(1), 1-52. doi:10.1128/MMBR.00043-12

- Römling, U., Rohde, M., Olsén, A., Normark, S., & Reinköster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol*, 36(1), 10-23. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760159>
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R. et al. Benziman, M. (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325(6101), 279-281. doi:10.1038/325279a0
- Salmond, C. V., Kroll, R. G., & Booth, I. R. (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 130(11), 2845-2850. doi:10.1099/00221287-130-11-2845
- Sambrook, J., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. Retrieved from http://books.google.de/books?id=tuuMrgEACAAJ&hl=&source=gbs_api
- Sarenko, O., Klauck, G., Wilke, F. M., Pfiffer, V., Richter, A. M., Herbst, S. et al. Hengge, R. (2017). More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of. *mBio*, 8(5). doi:10.1128/mBio.01639-17
- Sawa, J., Heuck, A., Ehrmann, M., & Clausen, T. (2010). Molecular transformers in the cell: lessons learned from the DegP protease-chaperone. *Curr Opin Struct Biol*, 20(2), 253-258. doi:10.1016/j.sbi.2010.01.014
- Schmidt, R., Zahn, R., Bukau, B., & Mogk, A. (2009). ClpS is the recognition component for *Escherichia coli* substrates of the N-end rule degradation pathway. *Mol Microbiol*, 72(2), 506-517. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06666.x
- Schrader, E. K., Harstad, K. G., & Matouschek, A. (2009). Targeting proteins for degradation. *Nat Chem Biol*, 5(11), 815-822. doi:10.1038/nchembio.250
- Schuenemann, V. J., Kralik, S. M., Albrecht, R., Spall, S. K., Truscott, K. N., Dougan, D. A., & Zeth, K. (2009). Structural basis of N-end rule substrate recognition in *Escherichia coli* by the ClpAP adaptor protein ClpS. *EMBO Rep*, 10(5), 508-514. doi:10.1038/embor.2009.62
- Seputiene, V., Daugelavicius, A., Suziedelis, K., & Suziedeliene, E. (2006). Acid response of exponentially growing *Escherichia coli* K-12. *Microbiol Res*, 161(1), 65-74. doi:10.1016/j.micres.2005.06.002
- Serra, D. O., & Hengge, R. (2014). Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol*, 16(6), 1455-1471. doi:10.1111/1462-2920.12483
- Serra, D. O., & Hengge, R. (2019). A c-di-GMP-Based Switch Controls Local Heterogeneity of Extracellular Matrix Synthesis which Is Crucial for Integrity and Morphogenesis of *Escherichia coli* Macrocolony Biofilms. *J Mol Biol*, 431(23), 4775-4793. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.001
- Serra, D. O., Klauck, G., & Hengge, R. (2015). Vertical stratification of matrix production is essential for physical integrity and architecture of macrocolony biofilms of *Escherichia coli*. *Environ Microbiol*, 17(12), 5073-5088. doi:10.1111/1462-2920.12991
- Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013a). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J Bacteriol*, 195(24), 5540-5554. doi:10.1128/JB.00946-13
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., & Hengge, R. (2013b). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio*, 4(2), e00103-13. doi:10.1128/mBio.00103-13

- Seshasayee, A. S., Bertone, P., Fraser, G. M., & Luscombe, N. M.** (2006). Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Curr Opin Microbiol*, 9(5), 511-519. doi:10.1016/j.mib.2006.08.007
- Severinov, K.** (2000). RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr Opin Microbiol*, 3(2), 118-125. doi:10.1016/s1369-5274(00)00062-x
- Sevier, C. S., & Kaiser, C. A.** (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(11), 836-847. doi:10.1038/nrm954
- Sevier, C. S., & Kaiser, C. A.** (2006). Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. *Antioxid Redox Signal*, 8(5-6), 797-811. doi:10.1089/ars.2006.8.797
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R.** (2007). Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol*, 189(23), 8746-8749. doi:10.1128/JB.01368-07
- Shen, Q. T., Bai, X. C., Chang, L. F., Wu, Y., Wang, H. W., & Sui, S. F.** (2009). Bowl-shaped oligomeric structures on membranes as DegP's new functional forms in protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(12), 4858-4863. doi:10.1073/pnas.0811780106
- Slonczewski, J. L., Fujisawa, M., Dopson, M., & Krulwich, T. A.** (2009). Cytoplasmic pH measurement and homeostasis in bacteria and archaea. *Adv Microb Physiol*, 55, 1-79, 317. doi:10.1016/S0065-2911(09)05501-5
- Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E., & Slonczewski, J. L.** (1994). Acid and base resistance in Escherichia coli and Shigella flexneri: role of rpoS and growth pH. *J Bacteriol*, 176(6), 1729-1737. doi:10.1128/jb.176.6.1729-1737.1994
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., & Hengge, R.** (2009). Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in Escherichia coli. *Microbiology*, 155(Pt 4), 1318-1331. doi:10.1099/mic.0.024257-0
- Sone, M., Akiyama, Y., & Ito, K.** (1997). Differential in vivo roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem*, 272(16), 10349-10352. doi:10.1074/jbc.272.16.10349
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., & Bertin, P.** (1999). Multiple control of flagellum biosynthesis in Escherichia coli: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon. *J Bacteriol*, 181(24), 7500-7508. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601207>
- Spurbeck, R. R., Tarrien, R. J., & Mobley, H. L.** (2012). Enzymatically active and inactive phosphodiesterases and diguanylate cyclases are involved in regulation of Motility or sessility in Escherichia coli CFT073. *mBio*, 3(5). doi:10.1128/mBio.00307-12
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J.** (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 6(3), 199-210. doi:10.1038/nrmicro1838
- Stock, J., & Da Re, S.** (2000). Signal transduction: response regulators on and off. *Curr Biol*, 10(11), R420-4. doi:10.1016/s0960-9822(00)00509-1
- Sundriyal, A., Massa, C., Samoray, D., Zehender, F., Sharpe, T., Jenal, U., & Schirmer, T.** (2014). Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *J Biol Chem*, 289(10), 6978-6990. doi:10.1074/jbc.M113.516195
- Takaya, A., Erhardt, M., Karata, K., Winterberg, K., Yamamoto, T., & Hughes, K. T.** (2012). YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. *Mol Microbiol*, 83(6), 1268-1284. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08007.x

- Tan, J., Lu, Y., & Bardwell, J. C.** (2005). Mutational analysis of the disulfide catalysts DsbA and DsbB. *J Bacteriol*, 187(4), 1504-1510. doi:10.1128/JB.187.4.1504-1510.2005
- Thongsomboon, W., Serra, D. O., Possling, A., Hadjineophytou, C., Hengge, R., & Cegelski, L.** (2018). Phosphoethanolamine cellulose: A naturally produced chemically modified cellulose. *Science*, 359(6373), 334-338. doi:10.1126/science.aao4096
- Thorpe, C., & Coppock, D. L.** (2007). Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. *J Biol Chem*, 282(19), 13929-13933. doi:10.1074/jbc.R600037200
- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G., & Varshavsky, A.** (1991). The N-end rule in bacteria. *Science*, 254(5036), 1374-1377. doi:10.1126/science.1962196
- Traxler, M. F., Zacharia, V. M., Marquardt, S., Summers, S. M., Nguyen, H. T., Stark, S. E., & Conway, T.** (2011). Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the 'feast to famine' gradient in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 79(4), 830-845. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07498.x
- Tsai, M. F., McCarthy, P., & Miller, C.** (2013). Substrate selectivity in glutamate-dependent acid resistance in enteric bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(15), 5898-5902. doi:10.1073/pnas.1301444110
- Tsai, M. F., & Miller, C.** (2013). Substrate selectivity in arginine-dependent acid resistance in enteric bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(15), 5893-5897. doi:10.1073/pnas.1301442110
- Ulrich, L. E., Koonin, E. V., & Zhulin, I. B.** (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol*, 13(2), 52-56. doi:10.1016/j.tim.2004.12.006
- Varshavsky, A.** (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22), 12142-12149. doi:10.1073/pnas.93.22.12142
- Varshavsky, A.** (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells*, 2(1), 13-28. doi:10.1046/j.1365-2443.1997.1020301.x
- Vicente, M., Chater, K. F., & De Lorenzo, V.** (1999). Bacterial transcription factors involved in global regulation. *Mol Microbiol*, 33(1), 8-17. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01445.x
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R.** (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes Dev*, 22(7), 945-953. doi:10.1101/gad.1645008
- Waller, P. R., & Sauer, R. T.** (1996). Characterization of degQ and degS, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease. *J Bacteriol*, 178(4), 1146-1153. doi:10.1128/jb.178.4.1146-1153.1996
- Wang, K. H., Oakes, E. S., Sauer, R. T., & Baker, T. A.** (2008). Tuning the strength of a bacterial N-end rule degradation signal. *J Biol Chem*, 283(36), 24600-24607. doi:10.1074/jbc.M802213200
- Wang, K. H., Sauer, R. T., & Baker, T. A.** (2007). ClpS modulates but is not essential for bacterial N-end rule degradation. *Genes Dev*, 21(4), 403-408. doi:10.1101/gad.1511907
- Wassarman, K. M., & Storz, G.** (2000). 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell*, 101(6), 613-623. doi:10.1016/s0092-8674(00)80873-9
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., & Hengge, R.** (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 62(4), 1014-1034. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05440.x
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R.** (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent

- genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol*, 187(5), 1591-1603. doi:10.1128/JB.187.5.1591-1603.2005
- Wilks, J. C., & Slonczewski, J. L.** (2007). pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry. *J Bacteriol*, 189(15), 5601-5607. doi:10.1128/JB.00615-07
- Winkler, A., Udvarhelyi, A., Hartmann, E., Reinstein, J., Menzel, A., Shoeman, R. L., & Schlichting, I.** (2014). Characterization of elements involved in allosteric light regulation of phosphodiesterase activity by comparison of different functional BlrP1 states. *J Mol Biol*, 426(4), 853-868. doi:10.1016/j.jmb.2013.11.018
- Wösten, M. M.** (1998). Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev*, 22(3), 127-150. doi:10.1111/j.1574-6976.1998.tb00364.x
- Wouters, M. A., Fan, S. W., & Haworth, N. L.** (2010). Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*, 12(1), 53-91. doi:10.1089/ars.2009.2510
- Wrase, R., Scott, H., Hilgenfeld, R., & Hansen, G.** (2011). The *Legionella* HtrA homologue DegQ is a self-compartmentalizing protease that forms large 12-meric assemblies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(26), 10490-10495. doi:10.1073/pnas.1101084108
- Xu, J., Li, T., Gao, Y., Deng, J., & Gu, J.** (2019). MgrB affects the acid stress response of *Escherichia coli* by modulating the expression of *iraM*. *FEMS Microbiol Lett*, 366(11). doi:10.1093/femsle/fnz123
- Yasid, N. A., Rolfe, M. D., Green, J., & Williamson, M. P.** (2016). Homeostasis of metabolites in. *R Soc Open Sci*, 3(8), 160187. doi:10.1098/rsos.160187
- Yazawa, K., & Furusawa, H.** (2019). Entropy-Driven Mechanisms between Disulfide-Bond Formation Protein A (DsbA) and B (DsbB) in. *ACS Omega*, 4(5), 8341-8349. doi:10.1021/acsomega.9b00474
- You, C., Okano, H., Hui, S., Zhang, Z., Kim, M., Gunderson, C. W. et al. Hwa, T.** (2013). Coordination of bacterial proteome with metabolism by cyclic AMP signalling. *Nature*, 500(7462), 301-306. doi:10.1038/nature12446
- Yuk, H. G., & Marshall, D. L.** (2004). Adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 to pH alters membrane lipid composition, verotoxin secretion, and resistance to simulated gastric fluid acid. *Appl Environ Microbiol*, 70(6), 3500-3505. doi:10.1128/AEM.70.6.3500-3505.2004
- Zhao, K., Liu, M., & Burgess, R. R.** (2007). Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Res*, 35(13), 4441-4452. doi:10.1093/nar/gkm456
- Zheng, Y., Sambou, T., Bogomolnaya, L. M., Cirillo, J. D., McClelland, M., & Andrews-Polymenis, H.** (2013). The EAL domain containing protein STM2215 (*rtn*) is needed during *Salmonella* infection and has cyclic di-GMP phosphodiesterase activity. *Mol Microbiol*, 89(3), 403-419. doi:10.1111/mmi.12284
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Römling, U.** (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*, 39(6), 1452-1463. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02337.x
- Zorraquino, V., García, B., Latasa, C., Echeverez, M., Toledo-Arana, A., Valle, J. et al. Solano, C.** (2013). Coordinated cyclic-di-GMP repression of *Salmonella* motility through YcgR and cellulose. *J Bacteriol*, 195(3), 417-428. doi:10.1128/JB.01789-12

7 ACKNOWLEDGEMENT TO THE SOURCES OF FIGURES

Abb. 2: Reprinted from Inaba, K., & Ito, K. (2008). Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim Biophys Acta*, 1783(4), 520-529. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.11.006, Copyright (2019), with permission from Elsevier.

Abb. 3A: Reprinted and shown part from Klauck, G., Serra, D. O., Possling, A., & Hengge, R. (2018). Spatial organization of different sigma factor activities and c-di-GMP signalling within the three-dimensional landscape of a bacterial biofilm. *Open Biol*, 8. doi:10.1098/rsob.180066, © 2018 The Authors, Published by the Royal Society

Abb. 3B: Reprinted and modified from Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013a). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J Bacteriol*, 195(24), 5540-5554. doi:10.1128/JB.00946-13, Copyright © 2013, American Society for Microbiology

8 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung angegebener Hilfsmittel verfasst habe

Ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben und besitze auch keinen entsprechenden. Die Dissertation oder Teile davon wurden nicht in anderen wissenschaftlichen Einrichtungen eingereicht, abgelehnt oder angenommen.

Ich nehme die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung zur Kenntnis und erkläre die Grundsätze der Humboldt-Universität Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlichen Praxis eingehalten zu haben.

(Datum / Unterschrift)